

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNG ZUR ROLLE DER FILAGGRIN-PEPTIDE FLG₁₄₆₋₁₉₉ UND
FLG₁₄₆₋₂₀₀ IN DER KUTANEN ABWEHR**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
BETTINA JOHANNA LAUDENBACH
aus Marburg

Kiel, 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jens-Michael Schröder, Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Grötzinger, Biochemisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2018

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 15.08.2018

gez.: Prof. Dr. Markus Bleich
(Stellv. Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|------------------------------------|----------|
| Abkürzungsverzeichnis | I |
|------------------------------------|----------|

| | |
|---|------------|
| Abbildungs- und Tabellenverzeichnis..... | III |
|---|------------|

| | |
|---|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Die Haut | 1 |
| 1.1.1 Aufbau der menschlichen Haut..... | 1 |
| 1.1.2 Epidermaler Differenzierungskomplex..... | 3 |
| 1.2 Schutzmechanismen der Haut | 3 |
| 1.3 Antimikrobielle Peptide..... | 5 |
| 1.3.1 „S100 Fused Type“-Proteine | 7 |
| 1.3.2 Filaggrin..... | 7 |
| 1.4 Zielsetzung der Arbeit | 9 |
| 2 Material und Methoden | 11 |
| 2.1 Oligonukleotide/Primer | 11 |
| 2.2 Vektoren..... | 11 |
| 2.3 Enzyme | 11 |
| 2.4 Kits..... | 12 |
| 2.5 Einwegmaterial..... | 12 |
| 2.6 Chemikalien und Reagenzien..... | 12 |
| 2.7 Geräte | 12 |
| 2.8 Nährmedien | 15 |
| 2.9 Puffer und Lösungen..... | 15 |
| 2.10 Mikroorganismen..... | 17 |
| 2.11 Molekularbiologische Methoden..... | 17 |
| 2.11.1 Polymerase-Kettenreaktion..... | 17 |
| 2.11.1.1 Standard-PCR | 18 |
| 2.11.1.2 „Colony-Check-PCR“ | 19 |
| 2.11.2 Agarose-Gelelektrophorese..... | 20 |
| 2.11.3 Gelextraktion..... | 21 |
| 2.11.4 Ligation | 21 |
| 2.11.5 Transformation..... | 22 |
| 2.11.5.1 Transformation in elektrisch kompetente <i>Escherichia coli</i> XL1 blue-Zellen im pJet1.2-Vektor..... | 22 |
| 2.11.5.2 Transformation in chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> DH5 alpha-Zellen..... | 23 |
| 2.11.5.3 Transformation in Expressionszellen <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysS | 24 |
| 2.11.6 Isolierung von Plasmid-DNA | 24 |
| 2.11.7 Restriktionshydrolyse | 24 |
| 2.11.8 DNA-Sequenzierung..... | 25 |
| 2.12 Rekombinante Expression der Fusionsproteine in <i>Escherichia coli</i>..... | 26 |
| 2.12.1 Struktur des Expressionsvektors | 26 |
| 2.12.2 Übernachtkulturen..... | 27 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.12.3 | Bestimmung der Bakteriendichte und Induktion | 27 |
| 2.13 | Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins | 28 |
| 2.13.1 | Aufschluss der Bakterien | 28 |
| 2.13.2 | Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie | 28 |
| 2.13.3 | HPLC-Läufe zum Nachweis des Fusionsproteins in den Proben | 29 |
| 2.13.3.1 | C18-Umkehrphasen-HPLC (250x10 mm) | 29 |
| 2.13.3.2 | C4-Umkehrphasen-HPLC | 30 |
| 2.13.4 | Größenausschlusschromatographie | 30 |
| 2.13.5 | Spaltung der Fusionsproteine mit Bromcyan und Aufreinigung der Proteine | 31 |
| 2.13.5.1 | C18-Umkehrphasen-HPLC (150x2 mm) | 31 |
| 2.13.6 | Massenspektrometrie | 31 |
| 2.13.7 | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 32 |
| 2.14 | Antimikrobielle Testung | 32 |
| 3 | Ergebnisse | 34 |
| 3.1 | Amplifikation und Ligation in den Klonierungsvektor pJet1.2 | 34 |
| 3.2 | Transformation in <i>Escherichia coli</i> XL1 blue-Zellen | 35 |
| 3.3 | Ligation in den Expressionsvektor und Transformation in <i>Escherichia coli</i> DH5 alpha-Zellen | 36 |
| 3.4 | Transformation in die Expressionszellen <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysS | 38 |
| 3.5 | Expression und Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine | 39 |
| 3.5.1 | Abspaltung des Fusionstags mit Bromcyan | 43 |
| 3.6 | Austestung der antimikrobielle Aktivität im radialen Plattendiffusionstest | 46 |
| 4 | Diskussion | 48 |
| 4.1 | Herstellung der Fusionsproteine | 50 |
| 4.2 | Antimikrobielle Aktivität von Profilaggrin | 53 |
| 4.3 | Spontane Alpha-N-6-Phosphogluconoylation | 55 |
| 4.4 | Antimikrobielle Peptide in Atopischer Dermatitis und Ichthyosis Vulgaris | 57 |
| 4.5 | Antimikrobielle Peptide als Therapeutika und Ausblick | 59 |
| 5 | Zusammenfassung | 62 |
| 6 | Anhang | 64 |
| 6.1 | Vektorkarten | 64 |
| 6.1.1 | pE-SUMO3-Vektor | 64 |
| 6.1.2 | pJet1.2-Vektor | 64 |
| 6.2 | Filaggrin-Fragmente | 65 |
| 6.2.1 | FLG ₁₄₆₋₁₉₉ | 65 |
| 6.2.2 | FLG ₁₄₆₋₂₀₀ | 65 |
| 6.3 | Buchstabencodes der Aminosäuren | 66 |

| | | |
|-----|---------------------------------|----|
| 6.4 | Buchstabencodes der Basen | 66 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 67 |
| 8 | Danksagung | 75 |
| 9 | Erklärung | 76 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ATCC | „American Type Culture Collection“ |
| <i>BamHI</i> | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> |
| bp | Basenpaare |
| bzw | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| CE | Cornified Cell Envelope |
| Da | Dalton |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| FLG | Filaggrin |
| g | Gramm |
| x g | Erdbeschleunigung, $g=9,80665 \text{ m/s}^2$ |
| h | Stunden |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| IPTG | Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid |
| kbp | Kilobasenpaare |
| LB | Lysogenic Broth |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| M | molar |
| Mb | Megabasen |
| mM | millimolar |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |

| | |
|-------------------|---|
| NPI-20 | Natrium-Phosphat-Imidazol (20mM) |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei 600 nm |
| PFLG | Profilaggrin |
| pH | Zehnerlogarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität |
| rpm | „Revolutions per Minute“ (Umdrehungen pro Minute) |
| s | Sekunden |
| <i>SdaI</i> | <i>Streptomycesspezies</i> |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TSB | Tryptic Soy Broth |
| U | Units |
| UV | ultraviolett |

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

| | |
|---|----|
| Abb. 1.1: Aufbau der Epidermis..... | 3 |
| Abb. 1.2: Gen- und Proteinstruktur von Profilaggrin und Filaggrin..... | 9 |
| Abb. 3.1: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der mittels PCR amplifizierten Filaggrin-Fragmente..... | 34 |
| Abb. 3.2: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel einer „Colony-Check-PCR“ zur Überprüfung der Transformation des pJet1.2-Vektors mit den ligierten Fragmenten FLG ₁₄₆₋₁₉₉ und FLG ₁₄₆₋₂₀₀ in <i>Escherichia coli</i> XL1 blue-Zellen..... | 35 |
| Abb. 3.3: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Restriktionshydrolyse mit <i>Bam</i> HI und <i>Sda</i> I..... | 36 |
| Abb. 3.4: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel einer „Colony-Check-PCR“ zur Überprüfung der Transformation des pE-SUMO3-Vektors mit ligierten Filaggrin-Fragmenten in die <i>Escherichia coli</i> DH5-alpha-Zellen..... | 37 |
| Abb. 3.5: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der PCR zur Überprüfung der Ligation der Inserts in den pE-SUMO3-Vektor..... | 38 |
| Abb. 3.6: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der „Colony-Check-PCR“ zur Überprüfung der Transformation der Plasmide mit den Inserts in die <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) <i>pLys</i> S-Zellen..... | 39 |
| Abb. 3.7: Repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung des rekombinant exprimierten Fusionsproteins FLG ₁₄₆₋₂₀₀ mittels C18-Umkehrphasen-HPLC..... | 40 |
| Abb. 3.8: Repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung des rekombinant exprimierten Fusionsproteins FLG ₁₄₆₋₁₉₉ mittels C4-Umkehrphasen-HPLC..... | 41 |
| Abb. 3.9: Massenbestimmung des FLG ₁₄₆₋₁₉₉ -Fusionsproteins mittels ESI-MS..... | 42 |
| Abb. 3.10: Massenbestimmung des FLG ₁₄₆₋₂₀₀ -Fusionsproteins mittels ESI-MS..... | 42 |
| Abb. 3.11: Repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung des mit Bromcyan behandelten Fusionsproteins FLG ₁₄₆₋₁₉₉ mittels C18-Umkehrphasen-HPLC..... | 43 |
| Abb. 3.12: Massenbestimmung des FLG ₁₄₆₋₁₉₉ -Proteins mittels MS..... | 44 |
| Abb. 3.13: Massenbestimmung des FLG ₁₄₆₋₂₀₀ -Proteins mittels MS..... | 45 |
| Abb. 3.14: Silber-gefärbte SDS-PAGE von verschiedenen Herstellungs- und Aufreinigungsschritten des FLG ₁₄₆₋₂₀₀ | 46 |
| Abb. 4.1: Aminosäuresequenz des N-Terminus von Profilaggrin..... | 50 |
| Abb. 6.1: Schematische Darstellung des pE-SUMO3-Expressionsvektors..... | 64 |

| | |
|---|----|
| Abb. 6.2: Schematische Darstellung des pJet1.2-Klonierungsvektors..... | 64 |
|---|----|

Tabellen:

| | |
|---|----|
| Tab. 2.1: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten <i>Escherichia coli</i> -Stämme..... | 23 |
| Tab. 2.2: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten Vektoren..... | 23 |
| Tab. 2.3: Ansätze zur Sequenzierung..... | 26 |
| Tab. 2.4: Gradient der C18-Umkehrphasen-HPLC-Proteinaufreinigung..... | 29 |
| Tab. 2.5: Gradient der C4-Umkehrphasen-HPLC-Proteinaufreinigung..... | 30 |
| Tab. 2.6: Gradient der C18-Umkehrphasen-HPLC-Proteinaufreinigung..... | 31 |
| Tab. 2.7: Daten zur Kultivierung der Mikroorganismen im Radialdiffusionstest..... | 33 |
| Tab. 3.1: Ergebnisse des Radialdiffusionstests für FLG ₁₄₆₋₁₉₉ und FLG ₁₄₆₋₂₀₀ | 47 |
| Tab. 4.1: Bisher getestete Filaggrin-Fragmente bezüglich antimikrobieller Aktivität..... | 49 |

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut ist mit einer Gesamtfläche von 1,5-2 m² und einem Gewicht von 3,5-10 kg die äußere Begrenzung des Menschen zur Umwelt und gleichzeitig auch das größte Organ (Moll, 2010). Mit dem mehrschichtig verhornten Plattenepithel stellt die Haut eine Barriere zur Umwelt dar. Sie schützt den Körper vor Austrocknung durch Wasserverlust, trägt zum mechanischen Schutz bei und ist ebenfalls an der Thermoregulation durch die Blutgefäße und Schweißdrüsen beteiligt. In der Haut sind Sinnesrezeptoren für die Wahrnehmung von Reizen wie Hitze, Kälte und Schmerz aus der Umwelt verantwortlich.

Weiterhin ist die Haut ein Teil der angeborenen Immunabwehr des Körpers (Elias, 2007).

1.1.1 Aufbau der menschlichen Haut

Die Hautdecke des Menschen wird in die Haut (Cutis) und Unterhaut (Subcutis) unterteilt. Die Cutis besteht aus Lederhaut (Dermis) und Oberhaut (Epidermis). Die Epidermis wiederum baut sich von innen nach außen aus weiteren vier Schichten auf: das *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und das *Stratum corneum* (s. Abb. 1.1). Das *Stratum basale* sitzt der Basallamina auf und bildet somit die Grenze zur *Dermis*. Da hier die Stammzellen lokalisiert sind, findet die ständige Produktion neuer Keratinozyten durch Mitose statt, die dann im Verlauf in die höheren Schichten der Epidermis aufsteigen und ausdifferenzieren (Alonso und Fuchs, 2003). Das *Stratum spinosum* besteht aus mehreren Schichten polygonaler Zellen, welche untereinander über Desmosomen verbunden sind (Lüllmann-Rauch, 2009). Sobald die Keratinozyten die Basalschicht verlassen haben, verlieren sie ihre mitotische Aktivität. Die terminale Differenzierung der Zellen beginnt und wird durch eine hohe intrazelluläre Calciumkonzentration gefördert (Freedberg *et al.*, 2003). Im *Stratum granulosum* sind die Keratinozyten durch die dort vermehrt synthetisierten Keratohyalin granula charakterisiert, die aus zytoplasmatischen Aggregaten aus Zytokeratinfilamenten und Proteinen wie Profilaggrin bestehen. Sie sind somit an dem Verhornungsprozess von basal nach superfizial beteiligt (Lüllmann-Rauch, 2009). In dieser Schicht beginnen die Zellen mit der Produktion der Proteine die dem epidermalen Differenzierungskomplex zugehörig sind. Hier werden u.a. die Proteine Loricrin, Involucrin und „small proline-rich proteins“ (SPRs) gebildet, parallel dazu findet auch die Spaltung von

Profilaggrin statt, welches in ca. 37 kDa große Filaggrin-Peptide gespalten wird (Hoffjan und Stemmler, 2007). Die Lamellenkörper („lamellar bodies“) beinhalten Lipide, die die Permeabilitätsbarriere der Epidermis aufrecht erhalten, indem sie nach ihrer Freisetzung den Interzellulärraum im *Stratum corneum* ausfüllen. Im *Stratum corneum* sind die Keratinozyten abgestorben, besitzen keine Zellorganellen mehr und dienen über die Erneuerung der Oberfläche der Schutzfunktion der Haut. Die dann als Korneozyten bezeichneten Zellen werden durch den „Cornified Cell Envelope“ (CE), die Korneodesmosomen und durch eine lipidreiche extrazelluläre Matrix zusammengehalten (Nemes und Steinert, 1999). Dieser CE ist ca. 15 nm dick, wird zunächst direkt unter der Zytoplasmamembran gebildet und befindet sich dann auf der Außenseite der Korneozyten („brick and mortar“-Modell, Nemes und Steinert, 1999). Hierbei handelt es sich um eine unlösliche Proteinstruktur, die über Isopeptidbrücken, gebildet durch Transglutaminasen (TGs), zusammengehalten wird und Ersatz der Plasmamembran in den Korneozyten ist. Die Transglutaminasen TG1, TG3 und TG5 verbinden die während der Ausdifferenzierung synthetisierten Proteine Involucrin, Loricrin, Trichohyalin und die Klasse der „small proline-rich proteins“ (SPRs) (Candi, 2005; Hoffjan und Stemmler, 2007). Dabei katalysieren sie calciumabhängig die Bindung der Proteine an die Zellmembran, wodurch sich die unlösliche Proteinstruktur des CE am inneren Blatt der Plasmamembran formt. Der CE besteht zu über 90% aus den Proteinkomponenten, der Rest beinhaltet eine Lipidkomponente aus überwiegend Ceramiden, Cholesterin und freien Fettsäuren (Freedberg *et al.*, 2003). Die Lipide sind in einer geringen Menge kovalent an den CE gebunden, der Hauptteil formt sich zu intrazellulären Lamellen, die dabei helfen, dass eine vollständige Barriere der Haut gebildet wird und so der Wasserverlust über die Haut verringert wird (Candi, Schmidt und Melino, 2005). Die Proteine des CE machen ca. 7-10% der Masse der Epidermis aus (Candi, Schmidt und Melino, 2005).

Erst die Korneozyten ermöglichen der Epidermis eine wichtige Funktion der Haut. Durch die regelmäßige Abstoßung dieser Zellschicht kommt es zur Eliminierung der sich auf den Korneozyten befindlichen Mikroflora. Die Diffusionsbarriere durch den „Cornified Cell Envelope“ verringert einen transepidermalen Wasserverlust sowie das Eindringen verschiedener Stoffe. Bis zu einem gewissen Grad schützt sie auch gegen Säuren (Lüllmann-Rauch, 2009).

Der Prozess der Zellerneuerung, ausgehend vom *Stratum basale* bis hin zum *Stratum corneum* wird terminale Differenzierung genannt und dauert etwa vier Wochen. Davon verbleiben die Keratinozyten die Hälfte der Zeit im *Stratum corneum* (Lüllmann-Rauch, 2009).

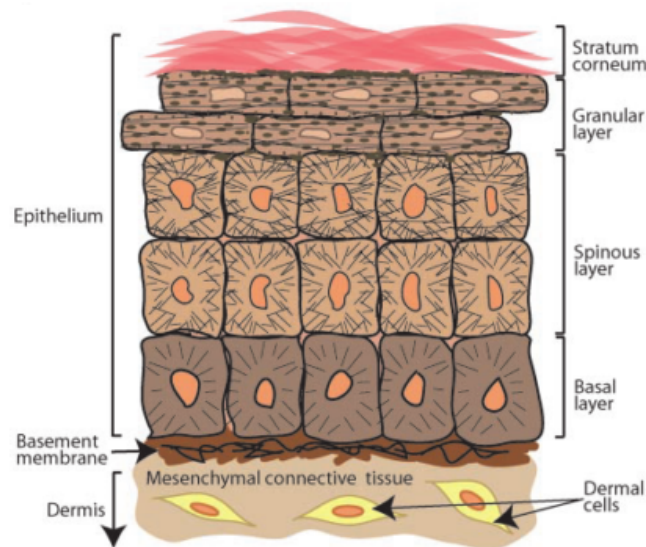


Abb. 1.1: Aufbau der Epidermis. Die menschliche Epidermis unterteilt sich in die folgenden vier Schichten: *Stratum basale* („Basal layer“), *Stratum spinosum* („Spinous layer“), *Stratum granulosum* („Granular layer“) und *Stratum corneum*. Die Abbildung deutet die unter der Basalzellschicht liegende Dermis mit ihren Zellen an (aus Alonso und Fuchs, 2003).

1.1.2 Epidermaler Differenzierungskomplex

Auf Chromosom 1 in der Region 1q21 befinden sich mehrere Gencluster, in der viele Gene für Proteine kodieren, die verstärkt während der terminalen Differenzierung exprimiert werden und demnach auch wichtige Aufgaben in der Barrierefunktion der Haut übernehmen. Diese Region wird epidermaler Differenzierungskomplex genannt, mit einer ungefähren Größe von 2 Mb (Mischke, 1996; Makino *et al.*, 2014). Die Proteine können im Wesentlichen vier Familien zugeordnet werden: der Familie der S100-Proteine, der Familie der „Late-Cornified-Envelope-Proteine“, der „Cornified-Cell-Envelope-Precursor-Proteine“ und der S100 Fused Type-Proteine (Mischke, Korge, Marenholz, Volz, Ziegler, 1996; Jackson *et al.*, 2005). Zu den S100 Fused Type-Proteinen gehört auch das in unserer Arbeitsgruppe untersuchte Profilaggrin.

1.2 Schutzmechanismen der Haut

Die menschliche Haut stellt eine große Kontaktfläche zur Umwelt dar. Auf der Hautoberfläche befinden sich eine Vielzahl von Mikroorganismen wie Viren, Pilze und

Bakterien, die potentiell Infektionen auslösen können. Damit es nicht zu einer Infektion kommt, entwickelte die Haut verschiedene Abwehrmechanismen (Schröder, 1999).

Eine intakte physikalische Barriere verhindert das Eindringen der Mikroorganismen durch die Ausreifung des *Stratum corneums*. Mit der Abstoßung der Korneozyten und die ständige Erneuerung der Oberfläche werden auch Mikroorganismen von der Hautoberfläche entfernt.

Die Lipidbarriere erschwert das Eindringen von Keimen. Auch der saure pH-Wert von 4,5-5 im äußeren *Stratum corneum* bildet einen Säureschutzmantel mit hoher Pufferkapazität (Elias, 2005).

Des Weiteren schützen mechanische und auch biochemische Barrieren vor dem Eindringen pathogener Organismen.

Eine weitere wichtige Rolle spielt die Mukosa, in der die Schleimproduktion stattfindet und in der durch die ständige Erneuerung der Schicht die Mikroorganismen entfernt werden.

Die Schutzmechanismen werden durch das Zusammenspiel humoraler und zellulärer Mechanismen des adaptiven und angeborenen Immunsystems ergänzt (Schröder, 1999; Yang, Chertov und Oppenheim, 2001).

Das angeborene zelluläre Immunsystem beinhaltet die Zellen des phagozytierenden Systems wie Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und natürliche Killerzellen und bietet Schutz vor einem breiten Spektrum an Pathogenen. Die neutrophilen Granulozyten tragen vorwiegend zur Abwehr von Bakterien und Pilzen bei. Die eosinophilen Granulozyten dienen der Parasitenabwehr und die Killerzellen inaktivieren überwiegend virusinfizierte Zellen. Zum humoralen System gehören das Komplementsystem, Lysozym, verschiedene Akut-Phase-Proteine und auch die „Toll-like“-Rezeptoren (TLRs) (Albiger *et al.*, 2007). Das angeborene Immunsystem erkennt zügig konservierte Oberflächenstrukturen von Pathogenen wie z.B. LPS der gram-negativen Bakterien. Daraufhin werden kaskadenartig Signalwege aktiviert, um eine umgehende Antwort auf die potentielle bakterielle Gefahr zu gewährleisten. Dabei werden die „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) erkannt, zu denen auch TLRs zählen (Albiger *et al.*, 2007).

Eine besondere Rolle in der angeborenen Immunabwehr spielt die Produktion der antimikrobiellen Peptide. Sie tragen ebenfalls mit der Abwehr gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen zur Schutzfunktion der Haut bei (s. 1.3).

Gegenüber dem angeborenen Immunsystem beinhaltet das adaptive Immunsystem Zellen, die bestimmte Erreger voneinander unterscheiden können und somit gezielt zur Abwehr beitragen. Dazu gehören die T- und B-Lymphozyten, die antigenpräsentierenden Zellen und die von den Plasmazellen produzierten Antikörper (Moll, 2010). Durch Ausbildung eines

immunologischen Gedächtnisses nach erneutem Erregerkontakt wird die Zeit vom Eindringen des Pathogens bis zur Abwehr verkürzt. Bei Erstkontakt mit dem Mikroorganismus dauert eine Immunantwort zwischen vier und sieben Tagen (Albiger *et al.*, 2007).

Die beiden Systeme sind nicht unabhängig voneinander zu betrachten, da die Mechanismen des adaptiven Immunsystems die des angeborenen Immunsystems beeinflussen und umgekehrt.

1.3 Antimikrobielle Peptide

Die Ära der Antibiotika begann mit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming im Jahr 1928 (Fleming, 1929). Seitdem es Antibiotika gibt, entwickelten sich durch die verbreitete Anwendung der verschiedenen Antibiotika Resistenzen der Bakterien gegenüber diesen (Hassan *et al.*, 2012). Zunehmend rückte das Problem der Resistenzbildung weltweit in den Fokus, da Menschen als Folge einer Infektion, gegen die kein adäquates Medikament gefunden werden konnte, starben. Aufgrund dieser sich ausbreitenden Multiresistenzen bestimmter Erreger gegen herkömmliche Antibiotika, sind Forscher bereits seit vielen Jahren auf der Suche nach wirksamen Alternativen. Dabei spielen die antimikrobiellen Peptide eine entscheidende Rolle, da sie als Mitglieder des angeborenen Immunsystems zahlreiche Funktionen besitzen. Ebenso zeigen eukaryotische antimikrobielle Peptide (AMPs) ein breiteres Spektrum gegenüber Bakterien als bakterielle AMPs (Hassan *et al.*, 2012).

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind kleine kationische Proteine, die als Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems dienen (Braff, 2005; Hancock und Diamond, 2000; Simanski, 2012). Durch ihre antimikrobielle Aktivität gegenüber einem breiten Spektrum von gram-negativen und gram-positiven Bakterien, sowie Pilzen und umhüllten Viren, sind sie in der Lage, diese Mikroorganismen abzutöten (Hancock, 2001). Bereits 1987 gelang es M. Zasloff antimikrobiell wirksame Peptide aus der Haut von Fröschen zu extrahieren, die Magainine (Zasloff, 1987). Mitte der 90er-Jahre konnte das erste humane AMP, das humane beta-Defensin-1 (hBD-1) aus Blutzellen des Menschen isoliert werden (Bensch, 1995). Kurze Zeit später ließ sich aus läsionalen Hautschuppen von Psoriasis-Patienten das humane beta-Defensin-2 (hBD-2) und aus humanen Keratinozyten das humane beta-Defensin-3 (hBD-3) isolieren (Harder *et al.*, 1997, 2001). Dies zeigte, dass neben Pflanzen auch Tiere und somit auch der Mensch über die Haut in der Lage ist, antimikrobiell wirksame Peptide zu produzieren und ein Abwehrsystem zur Eliminierung von Mikroorganismen besitzt (Schröder, 1999; Zasloff, 2002). Auch in gesunder Haut ließ sich das Protein Ribonuklease 7

(RNase7) isolieren, welches antimikrobiell aktiv ist (Harder und Schröder, 2002). Die Wirksamkeit dieser Peptide kann an den Pflanzen und Wirbellosen demonstriert werden, da diese Organismen nur eine angeborene, aber keine adaptive Immunität besitzen (Schröder, 1999).

Die potenziellen Wirkmechanismen der AMPs sind bislang am besten für bakterielle Zielstrukturen untersucht. Sie haben verschiedene Wirkmechanismen, um die Mikroorganismen innerhalb kürzester Zeit abzutöten.

Sowohl das humane Cathelicidin LL-37 und die humanen beta-Defensine 1-4 (hBD-1 bis -4) binden durch ihre positive Ladung an die negativ geladenen Oberflächen von Bakterien, Viren und Pilzen (Izadpanah und Gallo, 2005). Diese elektrostatische Anziehung ist unspezifisch; so binden die kationischen antimikrobiellen Peptide bei gram-negativen Bakterien z.B. an die Phosphatgruppen des LPS, bei gram-positiven Bakterien an die Lipoteichonsäuren in der Zellwand (Peschel *et al.*, 1999; Yeaman und Yount, 2003; Brogden, 2005). Oben genannte AMPs haben einen amphipathischen Aufbau mit einem hydrophoben Anteil gegenüber der kationischen Seite. Dadurch wird das Eindringen in die Zellmembran von Bakterien erleichtert. Es wird vermutet, dass es zur Zerstörung der Zelle über Porenbildung kommt, was zu einer Änderung der Membranpermeabilität führt (Hale und Hancock, 2007; Harder, 2007a; Zasloff, 2009). Somit kann der bestehende Ionengradient über der Zelle nicht aufrecht erhalten werden und es kommt innerhalb von Minuten zur Zelllyse (Izadpanah und Gallo, 2005).

Das hBD-1 besitzt antimikrobielle Aktivität durch Reduktion der Disulfidbrücken (Schröder, BO *et al.*, 2011).

Psoriasin als AMP ist gegen das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* wirksam. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Mechanismen beschädigt dieses Protein nicht die Zellmembran. Es wird angenommen, dass der Entzug von essenziellen Zink-Ionen die antimikrobielle Wirksamkeit bedingt (Gläser *et al.*, 2005).

Zusätzlich besitzen hBD-1 bis -3 auch eine chemotaktische Wirkung auf CD4-positive T-Zellen und dendritische Zellen (Schauber und Gallo, 2007).

AMPs wirken ebenso chemotaktisch und immunmodulatorisch und sorgen für eine Interaktion zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem (Yang, Chertov und Oppenheim, 2001; Harder, Gläser und Schröder, 2007b). Ein Beispiel ist das hBD-2, welches chemotaktische Eigenschaften gegenüber dendritischen Zellen und Gedächtnis-T-Zellen besitzt. Durch hBD-2 wird eine Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem hergestellt (Harder, 2001).

Aktuell lassen sich die AMPs in vier Hauptgruppen einteilen: Defensine, Ribonukleasen, Cathelicidine und S100-Proteine.

Einige AMPs werden kontinuierlich auf der Haut sezerniert (wie z. B. RNase7), während die Bildung anderer erst durch den Kontakt mit den entsprechenden Mikroorganismen oder bei Infektionen der Haut induziert wird. Zu den induzierbaren Peptiden gehören z. B. hBD-2 und hBD-3 (Schröder und Harder, 2006).

AMPs spielen in verschiedenen Hauterkrankungen eine entscheidende Rolle. So kommt es bei der atopischen Dermatitis im Verhältnis zu psoriatischer Haut zu einer verminderten AMP-Expression durch niedrigere Konzentrationen von hBD-2 und LL-37 (Ong *et al.*, 2002). Durch die Suppression der AMPs kann eventuell die erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Staphylococcus aureus*-Infektionen erklärt werden (Boguniewicz und Leung, 2010). Im Gegensatz dazu findet bei der Psoriasis vulgaris im Vergleich zur gesunden Haut eine AMP-Überexpression statt, die lokal durch Mikroorganismen und durch endogene proinflammatorische Zytokine induziert wird (Harder und Schröder, 2005). Die hohe Expression in der Haut kann auch hier eine Erklärung dafür sein, dass weniger Hautinfektionen in psoriatischer Haut auftreten (Henseler und Christophers, 1995).

1.3.1 „S100 Fused Type“-Proteine

Zu der Gruppe der „S100 Fused Type“-Proteine zählen Trichohyalin, Trichohyalin-like-1, Hornerin, Repetin, Cornulin, Filaggrin-2 und Profilaggrin (Makino *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011).

Die Gene der „S100 Fused Type“-Proteine sind im epidermalen Differenzierungskomplex auf Chromosom 1q21 kodiert und tragen u.a. zur der Homöostase der Epidermis bei. Die „Fused Type“-Proteine enthalten sowohl typische Merkmale der S100-Proteine, als auch Merkmale der „Cornified Cell Envelope“-Proteine. Die S100-Proteine sind durch ihre N-terminalen Ca^{2+} -Bindungsdomänen mit zwei EF-Hand-Domänen charakterisiert. Die „Cornified Cell Envelope“-Proteine zeichnen sich durch zahlreiche Tandemsequenz-Wiederholungen aus (Candi, Schmidt und Melino, 2005).

1.3.2 Filaggrin

Profilaggrin ist ein histidinreiches, aus 4061 Aminosäuren bestehendes Vorläuferprotein mit einer Molekülmasse von ca. 400 kDa, welches im *Stratum granulosum* Hauptbestandteil der F-Keratohyalin granula ist und als unlösliches und hochphosphoryliertes Proprotein exprimiert

wird (s. Abb. 1.2) (Sandilands *et al.*, 2009). Profilaggrin besitzt noch keine Keratin-bindende Aktivität, sie entsteht durch die Prozessierung während der terminalen Differenzierung. Im Zuge der terminalen Differenzierung wird es dephosphoryliert und proteolytisch in Filaggrin-Einheiten gespalten, die sich je aus 10-12 identischen Filaggrin-Einheiten zusammensetzen und auf beiden Seiten von zwei partiellen Filaggrin-Einheiten, sowie dem N- und C-Terminus flankiert werden (Gan, 1990; McKinley-Grant *et al.*, 1989; Presland und Dale, 1992).

Jede Filaggrin-Einheit besteht aus 324 Aminosäuren. Des Weiteren weist jede Einheit eine Linker-Region auf, die proteolytisch während der Prozessierung gespalten wird (Sandilands *et al.*, 2009). Im Rahmen der terminalen Differenzierung zur Erneuerung der Hautoberfläche werden Keratin-Filamente durch Filaggrin gebündelt und zu großen Makrofibrillen angeordnet. Im Anschluss erfolgt das „Crosslinking“ dieser durch die TGs (Sandilands *et al.*, 2009).

Der N-Terminus mit insgesamt 293 Aminosäuren besteht aus einer A-Domäne mit 81 Aminosäuren und einer B-Domäne mit 212 Aminosäuren. In der A-Domäne befinden sich zwei Calcium-bindende EF-Hand-Motive, die eine starke Ähnlichkeit zu den S100-Proteinen aufweisen. Die B-Domäne ist hydrophil und kationisch, hier befinden sich auch die zu untersuchenden Fragmente dieser Arbeit (Pearson, Dale und Presland, 2002; Presland *et al.*, 1992).

Kodiert wird es durch das FLG-Gen im Locus 1q21, welches drei Exons und zwei Introns besitzt (Presland *et al.*, 1992; Markova *et al.*, 1993). Das Exon 1 besteht aus 15 bp und beinhaltet einen nicht-kodierenden Bereich („5' untranslated region“). Exon 2 besteht aus 159 bp und enthält das Startkodon. Der Großteil der kodierenden Sequenz befindet sich in Exon 3. Es hat eine Größe von 12-14 kb und enthält neben den 10-12 Filaggrin-Einheiten auch den C-Terminus (Hoffjan und Stemmler, 2007; Sandilands *et al.*, 2009). Die Rolle des C-Terminus ist noch nicht vollständig geklärt, es wird angenommen, dass dieser eine Rolle in der Prozessierung von Profilaggrin zu Filaggrin spielt (Sandilands *et al.*, 2007).

Filaggrin hat drei entscheidende Aufgaben im Rahmen der terminalen Differenzierung. Zum einen, die Anordnung der Keratin-Filamente zu Bündeln, was dann zum Kollaps des Zytoskeletts der Zelle führt und somit die abgeflachte Zellschicht entstehen lässt (das *Stratum corneum*). Zum anderen hat es die Kontrolle über die Änderung der Zellformation und dient der Aufrechterhaltung der epidermalen Konsistenz (Candi, Schmidt und Melino, 2005).

Eine Übersicht der Gen- und Proteinstruktur ist in Abb. 1.2 dargestellt.

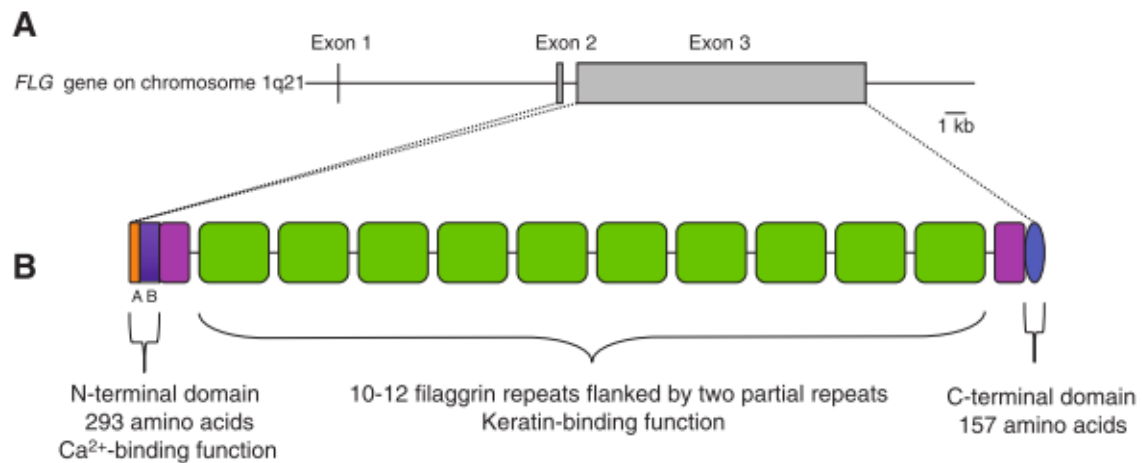


Abb. 1.2: Gen- und Proteinstruktur von Profilaggrin und Filaggrin. A: Das Profilaggrin-Gen ist innerhalb des epidermalen Differenzierungskomplexes auf Chromosom 1q21 lokalisiert. Das Gen besteht aus drei Exons und zwei Introns, wobei der Hauptteil der Proteinsequenz durch Exon 3 kodiert wird. B: Profilaggrin wird als Polyprotein exprimiert und enthält 10-12 nahezu identische Filaggrin-Einheiten, die je 324 Aminosäuren lang sind. Sie werden durch Linker-Regionen miteinander verbunden. Die N-terminale und C-terminale Domäne sind ebenfalls dargestellt (aus Sandilands *et al.*, 2009).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Untersuchungen aus antimikrobiell aktiven Proteinextrakten des *Stratum corneums* gesunder Menschen nach Auftrennung mittels HPLC zeigten neben den drei dominierenden antimikrobiellen Proteinen RNase-7, Psoriasin und Lysozym noch weitere Proteine und Peptide.

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits für eine Reihe von Proteinen der Epidermis eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen, u.a. für Proteinfragmente der „S100-Fusion-Type-Proteine“ Hornerin und für Filaggrin-2 (Ifapsoriasin) (Hansmann, Schröder und Gerstel, 2015).

In Untersuchungen aus antimikrobiell aktiven Proteinextrakten des *Stratum corneums* gesunder Menschen nach Auftrennung mittels HPLC wurden kürzlich Fragmente des Profilaggrins identifiziert, die der B-Domäne in der N-terminalen Region zugeordnet werden konnten.

Die Ergebnisse ließen vermuten, dass auch Fragmente des dominierenden „S100-Fusion-Type-Protein“ Profilaggrin antimikrobielle Eigenschaften aufweisen könnten.

Um die Hypothese zu testen, dass Profilaggrin-Peptide dieser Region auch zur Gruppe der antimikrobiell wirksamen Peptide gehören, wurden diese in *Escherichia coli* zunächst als

Fusionsproteine rekombinant exprimiert. Dabei zeigten von mehreren getesteten Filaggrin-Fragmenten FLG₈₇₋₁₉₇ (Karsch, 2011), FLG₁₂₃₋₂₀₀ (Schulz, 2010), FLG₇₆₄₋₉₀₃ und FLG₂₈₄₉₋₂₉₀₀ (Schmidt, 2012) antimikrobielle Aktivität.

Ziel dieser Arbeit war es, zwei weitere FLG-Peptide, die in den antimikrobiell aktiven HPLC-Fraktionen vorhanden waren, FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀, rekombinant herzustellen, aufzureinigen und hinsichtlich möglicher antimikrobieller Eigenschaften zu untersuchen, um eine Aussage darüber liefern zu können, ob diese N-terminalen Profilaggrin-Peptide einen direkten Beitrag zur angeborenen Immunantwort der Haut leisten.

2 Material und Methoden

| Material | Hersteller |
|---|-------------------|
| 2.1 Oligonukleotide/Primer | |
| pESUMO3-FLG-436-F, 10µM (35 bp) (GCACCTGCAGGAGATGGAAACAGGGGGGAAAAGGC) | Sigma |
| pESUMO3-FLG-597-R, 10µM (33 bp) (GCAGGATCCTCACCTCTTCCTATTGTCTCCTAA) | Sigma |
| pESUMO3-FLG-600-R, 10µM (33 bp) (GCAGGATCCTCATAGCCTCTTCCTATTGTCTCC) | Sigma |
| pJet1.2-Forward-Sequencing-Primer, 10µM (23 bp) (CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC) | Thermo Scientific |
| pJet1.2-Reverse-Sequencing-Primer, 10µM (24 bp) (AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG) | Thermo Scientific |
| T7-promotor-long, 10µM (21 bp) (TAATACGACTCACTATAGGGG) | Sigma |
| T7-Reverse, 10µM (20 bp) (TAGTTATTGCTCAGCGGTGG) | Sigma |
| 2.2 Vektoren | |
| pJet1.2/blunt-Klonierungsvektor | Thermo Scientific |
| pE-SUMO3-Expressionsvektor | LifeSensors |
| 2.3 Enzyme | |
| <i>Bam</i> HI, Fast Digest | Fermentas |
| <i>Sda</i> I, Fast Digest | Fermentas |
| Phusion Hot Start II, 2U/µl | Thermo Scientific |
| Taq-DNA-Polymerase 5 U/µl | Genaxxon |
| T4 Ligase (5U/µl, CloneJET PCR Cloning Kit) | Thermo Scientific |
| T4 Ligase (1U/µl) | Fermentas |

2.4 Kits

| | |
|--------------------------------|-------------------|
| GeneJET™ Gel Extraction Kit | Fermentas |
| Zymoclean Gel DNA Recovery Kit | Zymo Research |
| Gene JET Plasmid Miniprep Kit | Fermentas |
| CloneJET PCR Cloning Kit | Thermo Scientific |

2.5 Einwegmaterial

| | |
|---|----------|
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| Probengefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 10 ml, 50 ml) | Sarstedt |
| Sterilfilter (0,45 µm, 0,22 µm) | Roth |

2.6 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|---------------------------------|------------|
| Acetonitril | Roth |
| Bromcyan | Roth |
| <u>DNA-Größenstandards:</u> | |
| Smart Ladder | Eurogentec |
| Gene Ruler™ 100bp Plus | Fermentas |
| dNTPs | Fermentas |
| Glycerin | Roth |
| HCl | Roth |
| <u>Protein-Massenstandards:</u> | |
| Spectra™ Multicolor Broad Range | Fermentas |
| Spectra™ Multicolor Low Range | Fermentas |
| Trifluoressigsäure (TFA) | Roth |
| Isopropanol | Roth |

2.7 Geräte

| | |
|-----------------------|-------------------|
| <u>Elektroporator</u> | |
| Micro Pulser™ | BioRad |
| <u>Gelkammern</u> | |
| Horizon 11·14 | Life Technologies |

FPLC

| | |
|---------------|---------------|
| ÄKTApurifier™ | GE Healthcare |
|---------------|---------------|

HPLC

Gradientenpumpen

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| Liquid Chromatograph LC-10AT VP | Shimadzu |
| FCV-10 AL VP | Shimadzu |
| SpectraSystem P4000 | Spectra Physics |

Detektor

| | |
|----------------------------|----------|
| UV-VIS Detector SPD-10A VP | Shimadzu |
|----------------------------|----------|

Entgaser

| | |
|---------------|-----------|
| Degasser DG-4 | Henggeler |
|---------------|-----------|

Integratoren

| | |
|--------------------|-----------------|
| SP 4270 Integrator | Spectra Physics |
|--------------------|-----------------|

Säulen

| | |
|----------------------------------|------------|
| Jupiter C18, 5u, 300Å, 250x10 mm | Phenomenex |
| Jupiter C18, 5u, 300Å, 150x2 mm | Phenomenex |
| Jupiter C4, 5u, 300Å, 250x10 mm | Phenomenex |

Säule für immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

| | |
|-------------|---------------|
| HisTrap 1ml | GE Healthcare |
|-------------|---------------|

Säule für Größenausschlusschromatographie

| | |
|-------------------------------|---------------|
| HiPrep 26/10 Desalting Column | GE Healthcare |
|-------------------------------|---------------|

Konzentratoren

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Lyophilisator Alpha 2-4 LSC | Christ |
| Concentrator 5301 | Eppendorf |

Laborwaage

| | |
|---------------|------|
| Analysenwaage | Kern |
|---------------|------|

Massenspektrometer

| | |
|----------|------------------|
| „QTOFII“ | Waters Micromass |
|----------|------------------|

Photometer

Nanodrop 1000 Spectrophotometer
Biophotometer

Thermo Scientific
Eppendorf

Inkubationsschüttler

Minitron

Infors HT

Rotationsschüttler (Vortexer)

Janke und Kunkel

Thermocycler

T3 Thermocycler
peqSTAR 96 Universal

Biometra
Peqlab

Thermoblock

TRIO-Thermoblock

Biometra

Ultraschall

Sonoplus GM 70

Bandelin Elektronik

UV-Dokumentation

Dual Intensitiy Transilluminator
BioDocII- Fotodokumentationsanlage

UVP
Biometra

Zentrifugen

Centrifuge 5415C
Centrifuge 5804R
Centrifuge 5417R

Eppendorf
Eppendorf
Eppendorf

H₂O-Aufbereitungsanlage

TKA Smart2Pure

Thermo Scientific

2.8 Nährmedien

LB-Medium 10g NaCl, 10g Soja-Pepton, 5g Hefe-Extrakt, H₂O ad 1l, pH 7,4

LB-Agar LB-Medium, zusätzlich 15 g Agar

SOC-Medium 0,5 % Hefe-Extrakt (w/v), 2 % Pepton (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose

Radialer Plattendiffusionstest

Overlay-Agarose 1 g Agarose, 3,4 g Caseinpepton, 0,6 g Sojamehlpepton, 0,5 g Glucose, 1 g NaCl, 0,5 g Kaliumhydrogenphosphat, 100 ml H₂O

Underlay-Agarose 1 g Agarose, 20 µl Tween 20, 1 ml TSB-Medium, 10 ml Stammlösung (Natriumphosphatpuffer; 0,1 M; pH 7,2), 90 ml H₂O

TSB-Medium 3g TSB, 100 ml H₂O

2.9 Puffer und Lösungen

10x FD Green Buffer Fermentas

10x Reaction Buffer Fermentas

5x Phusion HF Reaction Buffer Thermo Scientific

10x Taq-Buffer E+ Genaxxon

DNA-Ladepuffer LVI 6x 0,25% Bromphenolblau, 30 % Glycerin, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

NPI-20-Puffer 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0

TAE-Puffer 40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0

SDS-PAGE

Laufgel 12%-ig 40 % Acrylamid/Bis (37,5:1), 3 M Tris, 0,3 % SDS, pH 8,45, 87 % Glycerol, 10 % APS, dH₂O und TEMED

Sammelgel 4%-ig 40 % Acrylamid, 3 M Tris, 0,3 % SDS, 10 % APS und TEMED

Anodenpuffer 10x 2 M Tris, pH 8,8

Kathodenpuffer 10x 1 M Tris, 1 M Tricine, 1 % SDS, pH 8,25

4x-Ladepuffer 4 % SDS, 0,3 M Tris, 60 % Glycerin, 0,01 % Coomassie G250, 20mM DTT

Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie

Elutionspuffer 20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4

HPLC-Laufmittel

C18-HPLC (150x2 mm):

Laufmittel A: 0,1 % Trifluoressigsäure in H₂O

Laufmittel B: 0,1 % Trifluoressigsäure in 80% Acetonitril

C18-HPLC (250x10 mm):

Laufmittel A: 0,05 % Trifluoressigsäure in H₂O

Laufmittel B: 0,05 % Trifluoressigsäure in 80 % Isopropanol

Laufmittel C: 65 % Acetonitril

C4-HPLC (250x10 mm):

Laufmittel A: 0,05 % Trifluoressigsäure in H₂O

Laufmittel B: 0,05 % Trifluoressigsäure in 80 % Isopropanol

Laufmittel C: 65 % Acetonitril

2.10 Mikroorganismen

| | |
|-------------------------------|-------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | XL1 blue |
| <i>Escherichia coli</i> | BL21 (DE3) <i>pLysS</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | DH5-alpha |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 11775 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 6538 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | NCTC 11446 |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC 24433 |

Alle ATCC-Stämme wurden freundlicherweise vom Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, bereitgestellt.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR) ist ein *In-vitro*-Verfahren zur Amplifikation eines DNA-Fragmentes (Mullis *et al.*, 1986). Unter physiologischen Bedingungen findet dies während der Replikation in allen Zellen des Körpers statt. Für die PCR benötigt man Einzel- oder Doppelstrang-DNA mit einer zumindest teilweise bekannten Sequenz. Daneben werden zwei Primer, sowie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Mg^{2+} -Ionen, ein Puffer zur Schaffung eines optimalen Milieus und eine DNA-Polymerase benötigt. Die sogenannte Taq-Polymerase ist hitzestabil und wurde aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert.

In einem Thermocycler laufen die drei unterschiedlichen Phasen der PCR in mehreren Zyklen ab. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang bei 95-98°C denaturiert und dadurch die Wasserstoffbrücken zwischen beiden Ketten gespalten, sodass nun zwei Einzelstränge vorliegen. Anschließend erfolgt die Primeranlagerung an das 3'-Ende der Zielsequenz, bei der die Temperatur Primer-spezifisch in der Regel auf 55-65°C herabgesetzt wird. Zuletzt erfolgt die Amplifikation der DNA-Sequenz bei 68-72°C, indem die Polymerase in 5'-3'-Richtung die komplementären Nukleotide an die Primersequenz anbaut und somit neue Doppelstränge synthetisiert.

2.11.1.1 Standard-PCR

Mittels einer Standard-PCR wurden aus dem von Dennis Karsch hergestellten Plasmid PFLG-2 die zwei Fragmente FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ generiert. Dieses Plasmid enthielt die Sequenzen FLG₁₂₃₋₂₀₀. Es wurde die Phusion Hot Start II DNA-Polymerase verwendet, die eine „Proofreading“-Funktion besitzt. Im Gegensatz zu einer Taq-Polymerase besitzt diese eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, welche somit fehlerhaft eingebaute Nukleotide während der Strangsynthese erkennen und austauschen kann. Die Standard-PCR diente der erstmaligen Vervielfältigung der entsprechenden Fragmente. Zur Überprüfung der korrekten Ligation der Plasmide wurde die DNA-Polymerase verwendet. Hierbei wurde kontrolliert, ob die Ligase korrekt gearbeitet hat und ob das Insert in den Vektor ligiert wurde und dieser insgesamt zirkulär vorliegt.

Reaktionsansatz für 50 µl:

| | |
|---------------------------|--|
| 10,0 µl | 5x Phusion HF Reaction Buffer |
| 1,0 µl | dNTPs (10 mM) |
| 2,5 µl | pE-SUMO3-FLG-436-F (10 µM) |
| 2,5 µl | pE-SUMO3-FLG-597-R und pE-SUMO3-FLG-600-R (je 10 µM) |
| 1,0 µl | Phusion Hot Start II DNA-Polymerase, 2 U/µl |
| 1,6 µl | Plasmid (57,9 ng/µl) |
| H ₂ O ad 50 µl | |

Bedingungen zur Durchführung der PCR:

| | | |
|------|-------|-------------|
| 98°C | 2 min | |
| 98°C | 30 s | } 7 Zyklen |
| 56°C | 30 s | |
| 72°C | 30 s | |
| 98°C | 30 s | } 31 Zyklen |
| 72°C | 45 s | |
| 72°C | 5 min | |
| 10°C | ∞ | |

Reaktionsansatz für 20 µl (PCR auf Ligationsansatz):

| | |
|---------------------------|---|
| 2,0 µl | 10x Taq-Buffer E+ |
| 0,4 µl | dNTPs (10 mM) |
| 0,4 µl | T7-promotor-long (10 µM) |
| 0,4 µl | T7-Reverse (10 µM) |
| 0,1 µl | Taq-Polymerase, 5 U/µl |
| 0,25 µl | Ligationsansatz FLG ₁₄₆₋₁₉₉ und FLG ₁₄₆₋₂₀₀ |
| H ₂ O ad 20 µl | |

Bedingungen zur Durchführung der PCR:

| | | |
|--------|--------|-------------|
| 95°C | 3 min | } 35 Zyklen |
| 95°C | 30 s | |
| 55,5°C | 30 s | |
| 72°C | 30 s | |
| 72°C | 10 min | |
| 10°C | ∞ | |

2.11.1.2 „Colony-Check-PCR“

Mit der „Colony-Check-PCR“ wurde überprüft, ob die Bakterien nach den jeweiligen Transformationen den Vektor mit dem korrekten Insert aufgenommen haben. Anhand der Primerwahl ist erkennbar, ob der Vektor geschlossen vorliegt, ob die Orientierung des Inserts im zirkulären Vektor korrekt ist und ob sich das Fragment überhaupt im Vektor befindet. Im pJet1.2-Vektor wurden zwei Vektor-spezifische Primer verwendet, da dieser bereits linear vorliegt und „blunt ends“ besitzt. Hier spielt die Orientierung des Fragments keine Rolle. Es wurden pro Fragment zehn Klone mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen und direkt mit dem 20 µl-PCR-Ansatz resuspendiert.

Im pE-SUMO3-Vektor erfolgte die Wahl des Forward-Primers so, dass er im Bereich des Inserts bindet, der Reverse-Primer bindet im Bereich des Vektors. Die Ausrichtung des Primers ergibt sich über die verschiedenen Überhänge. Hier wurden wie ebenfalls die jeweils zehn bzw drei Klone mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen und mit dem 20 µl-PCR-Ansatz resuspendiert.

Reaktionsansatz für 20 µl (im pJet1.2-Vektor nach Transformation in die *Escherichia coli* XL1 blue-Zellen; s. 2.11.5.1):

| | |
|------------------|---|
| 2,0 µl | 10x Taq-Buffer E+ |
| 0,4 µl | dNTPs (10 mM) |
| 0,4 µl | pJet1.2-Forward-Sequencing-Primer (10 µM) |
| 0,4 µl | pJet1.2-Reverse-Sequencing-Primer (10 µM) |
| 0,1 µl | Taq-Polymerase, 5 U/µl |
| H ₂ O | ad 20 µl |

Bedingungen zur Durchführung der PCR im pJet1.2-Vektor:

| | | |
|------|-------|-------------|
| 95°C | 5 min | |
| 95°C | 30 s | } 30 Zyklen |
| 60°C | 30 s | |
| 72°C | 30 s | |
| 72°C | 5 min | |
| 10°C | ∞ | |

Reaktionsansatz für 20 µl (im pE-SUMO3-Vektor nach Transformation in die *Escherichia coli* DH5-alpha-Zellen; s. 2.11.5.2 und in die *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen; s. 2.11.5.3):

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| 2,0 µl | 10x Taq-Buffer E+ |
| 0,4 µl | dNTPs (10 mM) |
| 0,4 µl | pE-SUMO3-FLG-436-F (10 µM) |
| 0,4 µl | T7-Reverse (10 µM) |
| 0,1 µl | Taq-Polymerase, 5 U/µl |
| H ₂ O ad 20 µl | |

Bedingungen zur Durchführung der PCR im pE-SUMO3-Vektor:

| | | |
|------|-------|-------------|
| 95°C | 5 min | |
| 95°C | 30 s | } 30 Zyklen |
| 58°C | 30 s | |
| 72°C | 30 s | |
| 72°C | 5 min | |
| 10°C | ∞ | |

2.11.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Trennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Negativ geladene DNA wandert durch das Agarosegel zur positiv geladenen Anode, dabei wandern kleinere Fragmente schneller als größere. Damit die Fragmente unter UV-Durchleuchtung detektiert werden können, wird Ethidiumbromid als fluoreszierender Farbstoff hinzugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA und somit leuchten die Banden in der Gelelektrophorese dort hell, wo sich Nukleinsäuren befinden.

Die Agarose-Gelelektrophorese fand im Anschluss an die Standard-PCR und „Colony-Check-PCR“ statt, um die generierten Fragmente auf ihre korrekte Größe hin zu überprüfen und sie

extrahieren zu können. Ebenfalls erfolgte sie im Anschluss an die Restriktionshydrolyse (s. 2.11.7), bei der kompatible Schnittstellen an Vektor und Insert generiert wurden.

Für die Herstellung der Gele wurden 0,8 bis 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden 15 µl Ethidiumbromid (3,33 mg/ml) hinzugegeben und dies anschließend in eine horizontale Laufkammer gefüllt. Bei Raumtemperatur härtete das Gel für mindestens 30 min aus. Die Proben wurden mit 6-fach Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Des Weiteren wurde zur Bestimmung der Bandengröße, je nach Größe der zu erwartenden Fragmente, ein entsprechender DNA-Marker verwendet (Smart Ladder bzw. Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA-Ladder).

2.11.3 Gelextraktion

Die unter UV-Licht detektierten Banden wurden entweder ausgestanzt oder mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Zur Isolierung des DNA-Materials aus dem Agarosegel wurde es mit dem GeneJET™ Gel Extraction Kit bzw. Zymoclean Gel DNA Recovery Kit nach Protokoll aufgereinigt und mit 30 µl bzw. 10 µl Tris HCl-Puffer (10 mM, pH 8,5) eluiert. Anschließend folgte die Bestimmung der Konzentration im Photometer.

2.11.4 Ligation

Bei der Ligation werden die DNA-Sequenz und die passende Schnittstelle des Vektors durch das Enzym Ligase miteinander verknüpft. Der pJet1.2-Vektor lag bereits linearisiert vor.

Dazu wurden vorher sowohl der pE-SUMO3-Vektor als auch die FLG-Sequenz mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *SdaI* verdaut und linearisiert, um kompatible DNA-Überhänge zu generieren.

Die Ligationen erfolgten zunächst mit dem Klonierungsvektor pJet1.2 und darauffolgend mit dem Expressionsvektor pE-SUMO3.

Ligationsansatz pJet1.2:

| | |
|------------------|---|
| 0,5 µl | pJet1.2-Vektor (25 ng) |
| 5,0 µl | 2x Reaction Buffer, CloneJET PCR Cloning Kit |
| 0,5 µl | T4 Ligase, 5 U/µl, CloneJET PCR Cloning Kit |
| je 0,5 µl | PCR-Produkt FLG ₁₄₆₋₁₉₉ -Fragment (35 ng) und FLG ₁₄₆₋₂₀₀ -Fragment (34 ng) |
| H ₂ O | ad 10 µl |

Es wurde ein 8-fach molarer Überschuss von Insert zu Vektor eingesetzt.

Ligationsansatz pE-SUMO3:

| | |
|---------------------------|---|
| 2,0 µl | pE-SUMO3-Vektor (50 ng) |
| 1,0 µl | 10x Reaction Buffer |
| 1,0 µl | T4 Ligase, 1 U/µl |
| 1,8 µl | FLG ₁₄₆₋₁₉₉ -Fragment (22,1 ng) bzw. 1,9 µl FLG ₁₄₆₋₂₀₀ -Fragment (22,5 ng) |
| H ₂ O ad 10 µl | |

Es wurde ein 16-fach molarer Überschuss von Insert zu Vektor eingesetzt.

Über Nacht erfolgte die Inkubation bei 4°C im Kühlschrank.

2.11.5 Transformation

Die Transformation beschreibt die Übertragung von rekombinanter DNA in einem Vektorsystem in kompetente Bakterienzellen, sodass diese die DNA vervielfältigen können. Dabei bedeutet kompetent, dass sie freie DNA aufnehmen können.

2.11.5.1 Transformation in elektrisch kompetente Escherichia coli XL1 blue-Zellen im pJet1.2-Vektor

Der Ligationsansatz im pJet1.2-Vektor wurde zunächst mit 10 µl Chloroform versetzt, gut durchmischt und für 5 min bei 19000 x g zentrifugiert. Das im Ligase-Puffer enthaltene Polyethylenglykol, welches die Effizienz der Elektroporation vermindern könnte, wurde so entfernt. Pro Ligationsansatz wurden 4 µl in 50 µl *Escherichia coli* XL1 blue-Zellen eingerührt, in eine auf Eis gekühlte Küvette gegeben und bei 1,8 kV mit einer Dauer von 4,2 ms bei FLG₁₄₆₋₁₉₉ und 4,1 ms bei FLG₁₄₆₋₂₀₀ elektroporiert (Elektroporator, Micro Pulser). Im Anschluss daran wurden zügig 500 µl SOC-Medium dazugegeben und anschließend in ein 13 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Inkubationsschüttler bei 200 rpm für eine Stunde.

Je 100 µl und 450 µl wurden pro Ansatz auf zwei LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (s. Tab. 2.1 und Tab. 2.2) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mittels „Colony-Check-PCR“ (s. 2.11.1.2) und darauffolgender Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.11.2) wurden je zehn zufällig ausgewählte Einzelkolonien auf die korrekten Inserts überprüft.

Tab. 2.1: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten *Escherichia coli*-Stämme

| <i>Escherichia coli</i> -Stamm | Antibiotika-Resistenz | Endkonzentration (µg/ml) |
|---|-----------------------|--------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> XL1 blue | Tetracyclin | 12,5 |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 alpha | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) <i>pLysS</i> | Chloramphenicol | 34 |

Tab. 2.2: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten Vektoren

| Vektor | Antibiotika-Resistenz | Endkonzentration (µg/ml) |
|----------|-----------------------|--------------------------|
| pJet1.2 | Ampicillin | 100 |
| pE-SUMO3 | Kanamycin | 50 |

2.11.5.2 Transformation in chemisch kompetente *Escherichia coli* DH5 alpha-Zellen

Die aufgereinigten Inserts der Plasmide im pJet1.2-Vektor aus der Transformation in die elektrisch kompetenten *Escherichia coli* XL1 blue-Zellen wurden zunächst aus dem pJet1.2-Vektor wieder herausgeschnitten (s. 2.11.7). Um sie anschließend in die chemisch kompetenten *Escherichia coli* DH5 alpha-Zellen transformieren zu können, fand die Ligation in den pE-SUMO3-Vektor statt (s. 2.11.4). Für die Transformation wurden je 2,5 µl der Ligationsansätze zu je 50 µl *Escherichia coli* DH5 alpha-Zellen gegeben und durch Umrühren vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für 30 s bei 42°C. Nach erneuter dreiminütiger Inkubation auf Eis wurde je 1 ml auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium dazupipettiert und im Anschluss für eine Stunde bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert.

Vor dem Ausplattieren wurden die Röhrchen für 5 min bei 7000 x g zentrifugiert und 500 µl des Überstands verworfen. Die Pellets wurden in den restlichen 500 µl resuspendiert und je 100 µl und 400 µl pro Ansatz wurden auf zwei LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (s. Tab. 2.1 und Tab. 2.2) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

Mittels „Colony-Check-PCR“ (s. 2.11.1.2) und darauffolgender Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.11.2) wurden je zehn zufällig ausgewählte Einzelkolonien auf die korrekten Inserts überprüft.

2.11.5.3 Transformation in Expressionszellen *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS

Nach durchgeführter Plasmidisolierung (s. 2.11.6) im Anschluss an die unter 2.11.5.2 beschriebene Transformation, erfolgte nun die Transformation in die Expressionszellen *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. Pro Fragment wurde 1 µl des ausgesuchten Plasmids transformiert. Die angetauten *Escherichia coli*-Bakterien wurden in die auf Eis gekühlten Küvetten gegeben, das jeweilige Plasmid hinzugegeben, vorsichtig in der Küvette vermischt und bei 1,8 kV mit einer Dauer von 5,0 ms bei FLG₁₄₆₋₁₉₉ und 4,9 ms bei FLG₁₄₆₋₂₀₀ elektroporiert. Danach erfolgte zügig die Zugabe von 1 ml SOC-Medium und anschließendes Pipettieren in ein 13 ml-Reaktionsgefäß. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C im Inkubationsschüttler. Die Ansätze wurden für 5 min bei 7000 x g zentrifugiert, 500 µl Überstand verworfen und die Pellets in den verbleibenden 500 µl resuspendiert. Je 100 µl und 400 µl pro Ansatz wurden auf zwei LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (s. Tab. 2.1 und Tab. 2.2) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.11.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Nach erfolgreicher Transformation wurde von der jeweiligen Kolonie eine Flüssigkultur angelegt. Dazu wurden je 3 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt (Ampicillin, Tetracyclin bzw. Kanamycin), drei Klone pro Fragment gepickt und über Nacht bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit dem „Gene JET Plasmid Miniprep Kit“.

2.11.7 Restriktionshydrolyse

Zunächst wurde das Insert in den pJet1.2-Klonierungsvektor kloniert mit dem Ziel, eine ausreichende Menge an DNA-Material der zu kodierenden Fragmente zu gewinnen. Damit die Inserts anschließend in den Expressionsvektor pE-SUMO3 ligiert werden konnten, mussten diese wieder aus dem pJet1.2-Vektor herausgeschnitten werden. Dafür war es erforderlich, zu Beginn die spezifischen Primer für die PCR (pE-SUMO3-FLG-436-F und pE-SUMO3-FLG-597-R bzw. pE-SUMO3-600-R) mit Überhängen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Sda*I auszustatten.

Reaktionsansatz (50 µl):

| | |
|---------------------------|---|
| Je 9,00 µl | Plasmid mit FLG ₁₄₆₋₁₉₉ (3,8 µg) und Plasmid mit FLG ₁₄₆₋₂₀₀ (3,7 µg) (im pJet1.2-Vektor) |
| 2,50 µl | <i>SdaI</i> |
| 2,50 µl | <i>BamHI</i> |
| 5,00 µl | FD Green Buffer 10x |
| H ₂ O ad 50 µl | |

Die Inkubation erfolgte 30 min im Thermocycler bei 37°C. Im Anschluss wurden die Proben in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschten Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. In der Gel-Extraktion erfolgte die Elution mit 10 µl Tris-HCl.

Für die Ligation der kodierenden FLG-Fragmente in den Expressionsvektor pE-SUMO3, musste dieser auch mit den entsprechenden Überhängen versehen werden.

Reaktionsansatz (60 µl):

| | |
|---------------------------|------------------------------|
| 32,8 µl | pE-SUMO3-Vektor (91,5 ng/µl) |
| 3,0 µl | <i>BamHI</i> |
| 3,0 µl | <i>SdaI</i> |
| 6,0 µl | FD Green Buffer 10x |
| H ₂ O ad 60 µl | |

Die Inkubation erfolgte 45 min im Thermocycler bei 37°C. Nach Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ausschneiden der entsprechenden Banden unter UV-Licht, erfolgte in der Gel-Extraktion die Elution mit 20 µl Tris-HCl.

2.11.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Synthese und diente der Überprüfung der korrekten Basenabfolge innerhalb der beiden Filaggrin-Fragmente. Mit dieser Methode lassen sich sowohl kurze DNA-Stränge als auch ganze Genome entschlüsseln. Der Unterschied zur PCR besteht darin, dass hier nur ein Primer verwendet wird und somit eine lineare Amplifikation erfolgt. Die Durchführung übernahm freundlicherweise das Institut für Klinische Molekularbiologie in Kiel. Tab. 2.3 zeigt einen Überblick der Ansätze zur Sequenzierung.

Tab. 2.3: Ansätze zur Sequenzierung

| Im pJet1.2-System | | |
|---------------------------|--|---|
| FLG ₁₄₆₋₁₉₉ | 1 µl Plasmid (426 ng) 0,5 µl pJet1.2-Forward-Primer H ₂ O ad 4 µl | |
| FLG ₁₄₆₋₂₀₀ | 1 µl Plasmid (411 ng) 0,5 µl pJet1.2-Forward-Primer H ₂ O ad 4 µl | |
| Im pE-SUMO3-System | Ansatz 1 | Ansatz 2 |
| FLG ₁₄₆₋₁₉₉ | 3 µl Plasmid (310 ng) 0,5 µl T7-Reverse-Primer H ₂ O ad 4 µl | 3 µl Plasmid (290 ng) 0,5 µl T7-Reverse-Primer H ₂ O ad 4 µl |
| FLG ₁₄₆₋₂₀₀ | 3 µl Plasmid (265 ng) 0,5 µl T7-Reverse-Primer H ₂ O ad 4 µl | 3 µl Plasmid (250 ng) 0,5 µl T7-Reverse-Primer H ₂ O ad 4 µl |

2.12 Rekombinante Expression der Fusionsproteine in *Escherichia coli*

2.12.1 Struktur des Expressionsvektors

Für die Expression der Fusionsproteine in den *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS*-Zellen wurde der pE-SUMO3-Vektor verwendet (s. Abb. 6.1). Mit diesem 5610 bp großen Vektor ist es möglich, ein Fusionsprotein zu exprimieren, welches N-terminal einen „Fusionstag“ aus sechs aufeinander folgenden Histidinen enthält. Dabei kodieren sechs aufeinanderfolgenden Basentriplets CAT für je ein Histidin. Nach Aufreinigung des Fusionsproteins im ersten Schritt durch die Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), lässt sich der „Fusionstag“ anschließend durch chemische Spaltung mit Bromcyan abtrennen. Der Expressionsvektor pE-SUMO3 besitzt eine „Multiple Cloning Site“ (MCS) mit verschiedenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme, welche das Einfügen eines Inserts erleichtern. Durch die Restriktionshydrolyse mit *Bam*HI und *Sda*I wird der pE-SUMO3-Vektor in eine lineare Form gebracht. Durch das Schneiden der Enzyme innerhalb ihrer Erkennungssequenz entstehen für *Bam*HI (Erkennungssequenz: GGATCC) ein 5'-GATC-Überhang und für *Sda*I (Erkennungssequenz: CCTGCAGG) ein 3'-TGCA-Überhang. Für die Fusion mit den Inserts mussten auch die Inserts entsprechend komplementäre Überhänge haben und wurden daher ebenfalls mit *Bam*HI und *Sda*I hydrolysiert (s. 2.11.7).

Bei der Kultivierung der Bakterien trägt der Vektor zur Selektion ein Gen für eine Kanamycin-Resistenz. Der Bakterienstamm *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS* steht unter der

Kontrolle des lacUV5-Promotors, der das Gen für die T7-RNA-Polymerase besitzt. Die T7-RNA-Polymerase transkribiert die Gensequenzen nach Induktion mit IPTG, die im pE-SUMO3-Vektor unter der Kontrolle der T7-Promotorregion stehen.

2.12.2 Übernachtskulturen

Für die Übernachtskulturen wurden je 10 ml LB-Medium mit je einer Einzelkolonie der oben beschriebenen *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C im Inkubationsschüttler mit 250 rpm inkubiert. Dem LB-Medium wurden die entsprechenden Antibiotika Kanamycin (50 µg/ ml) und Chloramphenicol (34 µg/ ml) dazugegeben.

2.12.3 Bestimmung der Bakteriendichte und Induktion

Für die Bestimmung der Bakteriendichte in dem angeimpften Nährmedium wurde die Optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen. Diese Messung erlaubt einen Rückschluss auf die Zelldichte der Bakterien. Dafür wurden die in 2.12.2 hergestellten Kulturen 1:10 verdünnt, als Referenz wurde das LB-Medium verwendet.

In je 250 ml LB-Medium mit den Antibiotika Kanamycin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) wurden die Expressionskulturen auf eine OD_{600nm} von 0,02 angeimpft. Für jedes Fragment wurden insgesamt 500 ml Expressionskultur angesetzt. Die Inkubation fand bei 37°C und 170 rpm im Inkubationsschüttler für 3,5 h statt, bis sich eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 einstellte. In dieser Zeit war eine regelmäßige OD-Bestimmung erforderlich.

Durch Zugabe von 250 µl IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid, Endkonzentration 1 mM) wurde die Proteinexpression induziert. Für weitere 3 h erfolgte die Inkubation bei 37°C und 170 rpm im Inkubationsschüttler.

Im Anschluss wurden die Kulturen für 10 min bei 4°C und 6000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterienpellets wurden pro 100 ml Kultur in 1 ml NPI-20-Puffer resuspendiert und anschließend bei -80°C gelagert.

Zur Kontrolle der Proteinexpression durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (s. 2.13.7) wurden direkt vor der Induktion mit IPTG und 3 h danach pro Fragment zwei Proben aus der Kultur entnommen. Die Berechnung der benötigten Probenmenge in µl erfolgte mit der Formel 90/OD₆₀₀. Nach Entnahme wurden die Proben jeweils für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets bei -20°C bis zur Analyse eingefroren.

2.13 Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins

2.13.1 Aufschluss der Bakterien

Für die Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine wurden die bei -80°C eingefrorenen Kulturen im Wasserbad bei Raumtemperatur für 10 min aufgetaut und wieder für 10 min bei -80°C eingefroren. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die DNA-Freisetzung erfolgte durch Zerstörung der Bakterien mittels Ultraschall. Für insgesamt 5 min wechselten sich in mehreren Zyklen 15 s Ultraschall und 30 s Inkubation auf Eis ab. Anschließend wurden die Proben für 75 min bei 4°C und $10.000 \times g$ zentrifugiert, sodass die Überreste der Bakterien im Pellet und das Fusionsprotein im Überstand zu finden waren. Der Überstand wurde sterilfiltriert (Porengröße $0,45 \mu\text{m}$) und auf eine Metallionen-Affinitätschromatographie-Säule aufgetragen (s. 2.13.2).

2.13.2 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

Die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) ist ein Trennverfahren für Proteine. Hiermit werden die sich noch im Überstand befindenden bakteriellen Proteine von den Fusionsproteinen getrennt. Die im Fusionsprotein vorhandenen Hexahistidin-Sequenzen interagieren mit den an die Säulenmatrix gebundenen Nickel-Ionen-Chelaten. Die Proteine der *Escherichia coli*-Bakterien treten aufgrund der fehlenden oder nur in einer geringen Anzahl vorkommenden Polyhistidin-Sequenzen nicht oder nur schwach in Wechselwirkung mit der Matrix, sondern befinden sich im Durchfluss. Der Gradient änderte sich innerhalb von 10 ml von 5 % auf 100 % Elutionspuffer. Anschließend wurden im Photometer die Konzentrationen der Fusionsproteine bestimmt.

Für den nachfolgenden Aufreinigungsprozess mittels HPLC wurde durch die Zugabe von Trifluoressigsäure (10 %) der pH-Wert des IMAC-Eluats von 8-9 auf 2-3 eingestellt, im Anschluss wurde für 5 min bei $11.000 \times g$ zentrifugiert und sterilfiltriert. Durch die Erniedrigung des pH-Wertes wird erreicht, dass die Proteine überwiegend protoniert vorliegen und mit den entgegengesetzt geladenen Seitenketten des Proteins ein Ionenpaar bilden.

2.13.3 HPLC-Läufe zum Nachweis des Fusionsproteins in den Proben

Die im Folgenden beschriebenen zwei HPLC-Verfahren dienten lediglich zur Kontrolle und zum Nachweis des Fusionsproteins in den Proben sowie für die Messung im Massenspektrometer.

2.13.3.1 C18-Umkehrphasen-HPLC (250x10 mm)

Die C18-Umkehrphasen-HPLC ist ein weiteres chromatographisches Trennverfahren zur Aufreinigung von Proteinen. Das Prinzip beruht auf Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und des Analyten in der mobilen Phase. Je nachdem wie stark die Wechselwirkungen sind, verbleibt der Analyt unterschiedlich lange in Wechselwirkung mit der stationären Phase. Im Chromatogramm zeigte die Retentionszeit, wann die Komponenten des Analyten nach Durchlaufen der Säule detektiert wurden. Dies geschieht über Messung der Absorption, es wird die Änderung zur mobilen Phase gemessen. Bei einer Wellenlänge von 215 nm lassen sich Proteine detektieren.

Das von der IMAC eluierte Material wurde mit Hilfe einer Jupiter C18-Säule aufgereinigt. Es wurde pro Lauf 1 ml des affinitätsgereinigten Fusionsproteins verwendet (FLG₁₄₆₋₁₉₉: 2,56 mg/ml, FLG₁₄₆₋₂₀₀: 2,34 mg/ml). Bei einer Durchflussrate von 2,5 ml/min wurde ein Gradient von Laufmittel A (0,05 % TFA in H₂O) zu Laufmittel B (80 % Isopropanol, 0,05 % TFA) verwendet. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 10 % Puffer B begann die Aufreinigung. Die Gradienten stiegen linear an. Nachdem sich die Fusionsproteine im ersten HPLC-Lauf im Durchlauf befanden, wurde die Konzentration herabgesetzt, von 10 % auf 3,1 %. Die Fraktionierung erfolgte manuell. Tab. 2.4 gibt einen Überblick über den verwendeten Gradienten der C18-HPLC.

Tab. 2.4: Gradient der C18-Umkehrphasen-HPLC-Proteinaufreinigung

| Zeit (min) | Konzentration Puffer B in % (80% Isopropanol, 0,05% TFA) |
|------------|--|
| 0,01 | 3,1 |
| 5 | 10 |
| 30 | 60 |
| 35 | 100 |
| 40 | 100 |

2.13.3.2 C4-Umkehrphasen-HPLC

Ebenso wie die C18-Umkehrphasen-HPLC ist auch die hier eingesetzte C4-Umkehrphasen-HPLC ein Trennverfahren für Proteine. Der hier verwendete Gradient aus der C18-HPLC von 3,1 % auf 100 % wurde beibehalten. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/ min wurde die Fraktionierung der HPLC unter folgenden Bedingungen manuell durchgeführt:

Tab. 2.5: Gradient der C4-Umkehrphasen-HPLC-Proteinaufreinigung

| Zeit (min) | Konzentration Puffer B in % (80% Isopropanol, 0,05% TFA) |
|------------|--|
| 0,01 | 3,1 |
| 15 | 60 |
| 25 | 70 |
| 35 | 100 |

Die präparative Aufreinigung der hergestellten Fusionsproteine begann mit der Größenausschlusschromatografie mittels der in der IMAC aufgereinigten Proben.

Mit der ersten Aufreinigung wurden lediglich die Fusionsproteine gereinigt, danach erfolgte erst die Auftrennung von dem mittels Bromcyan gespaltenen Zielprotein.

2.13.4 Größenausschlusschromatographie

Nachdem über die HPLC-Aufreinigung und anschließender Massenspektrometrie anhand der Massenbestimmung gezeigt werden konnte, dass sich in den getesteten Proben die gewünschten Fusionsproteine befanden, wurde mit dem restlichen Material aus der IMAC eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Dabei findet eine Trennung der Analytenbestandteile nach der Größe statt. Als Matrix diente eine Säule aus Dextran. Der Unterschied zur Gelelektrophorese besteht darin, dass hier kein Strom angelegt wird. Kleine Moleküle wandern langsamer über die Säule, da sie aufgrund ihrer geringen Größe in die Poren der Matrix eintreten. Dadurch werden die Laufstrecke und auch die Retentionszeit verlängert. Dementsprechend wandern hier große Moleküle schneller über die Matrix. Die Fusionsproteine übersteigen die Porengröße und verlassen das Gel daher schneller. Durch vorheriges Zentrifugieren bildeten sich zwei Phasen, deren Überstand konstant mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml gegen H₂O entsalzt wurde. Anschließend wurde die Konzentration der entsalzten Fraktion, die das Fusionsprotein beinhaltet, gemessen. Nach Zentrifugieren der Proben für 1 min bei 6000 x g und 22°C blieben diese nach Einfrieren für eine Stunde bei -80°C über Nacht im Lyophilisator.

2.13.5 Spaltung der Fusionsproteine mit Bromcyan und Aufreinigung der Proteine

Die das Fusionsprotein enthaltenden lyophilisierten Proben wurden zunächst in einer 0,25 M-HCl-Lösung resuspendiert, um anschließend in 50-fach bzw. 500-fach molarem Überschuss zum Methionin das Bromcyan dazu zu geben (5 mM). Bromcyan spaltet C-terminal nach der Aminosäure Methionin den Fusionstag des Fusionsproteins ab, sodass das Zielprotein frei vorlag. Da nur ein Methionin in der Aminosäuresequenz vorhanden war, spaltete es ausschließlich an der gewünschten Stelle, sodass keine weiteren Fragmente entstanden. Der Ansatz inkubierte über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur leicht schüttelnd.

2.13.5.1 C18-Umkehrphasen-HPLC (150x2 mm)

In der folgenden C18-Umkehrphasen-HPLC erfolgte die Aufreinigung der Proben aus der Bromcyanspaltung mit anschließender Überprüfung der Masse im Massenspektrometer. Die kleinere Säule wurde verwendet, um die Wechselwirkungen mit der Säule möglichst gering zu halten, damit der Verlust von Material minimiert wird. Außerdem trennen kleinere Säulen ein geringeres Probenvolumen besser auf. Hier konnte anhand der Retentionszeiten das Fusionsprotein vom Protein nach Spaltung unterschieden werden. Tab. 2.6 gibt einen Überblick über den Gradienten der HPLC.

Tab. 2.6: Gradient der C18-Umkehrphasen-HPLC-Proteinaufreinigung

| Zeit (min) | Puffer A in % (0,1% TFA in H ₂ O) | Puffer B in % (0,1% TFA in 80% Acetonitril) |
|------------|--|---|
| 0 | 100 | 0 |
| 1 | 100 | 0 |
| 10 | 75 | 25 |
| 40 | 30 | 70 |
| 50 | 0 | 100 |

2.13.6 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein Verfahren zur Analyse der Masse von Proteinen und wurde zur Überprüfung dieser vor und nach der Bromcyanspaltung mit anschließender C18-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt. Die Massenbestimmung der Fusionsproteine sowie der Proteine FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ erfolgte mit der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI) an einem Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer (QTOF II) im Positiv-Ionen-Modus. Das Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle,

die die zu analysierende Probe in die Gasphase überführt und ionisiert. In einem elektrischen Feld werden die Ionen beschleunigt und zum Analysator geführt, der die Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis zuordnet.

Die entstandenen Rohdaten wurden hintergrundkorrigiert und anhand der „MassLynx-Software 4.0“ analysiert.

2.13.7 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine elektrophoretisch nach ihrer Größe auf und diente der Induktionskontrolle während der Expression. Zusätzlich wurden zur Übersicht auch beide FLG-Fusionsproteine nach Aufreinigung durch die C4-Umkehrphasen-HPLC und die jeweiligen FLG-Proteine nach der Bromcyan-Spaltung aufgetragen. Es wurde ein 4 %-iges Sammelgel sowie ein 12 %-iges Laufgel verwendet. Sowohl der Kathodenpuffer als auch der Anodenpuffer wurden 1x eingesetzt. Jede aufzutragende Probe wurde in 10 µl H₂O resuspendiert, mit 4 µl eines 4x-Beladungspuffers versehen und anschließend für 10 min bei 95°C im Thermocycler erhitzt. Als Größenstandard wurden der Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder und der Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder verwendet. Die zunächst an die Elektrophoresekammer angelegte Spannung von 100 V wurde nach einer halben Stunde auf 120 V erhöht. Die Anfärbung der Proteine erfolgte nach dem modifizierten Protokoll der Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (modifiziert nach Heukeshoven und Dernick, 1988).

2.14 Antimikrobielle Testung

Die rekombinant hergestellten Profilaggrin-Proteine FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ wurden auf eine mögliche antimikrobielle Aktivität mit Hilfe des radialen Plattendiffusionstests untersucht. Diese Tests führte freundlicherweise Frau Silvia Voss im Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Kiel) durch. Als Testorganismen dienten der gram-positive Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die gram-negativen Stämme *Escherichia coli* ATCC 11775 und *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 11446, sowie die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433.

Die Bakterien wurden in 8 ml TSB-Medium eingimpft und über Nacht bei 37°C im Inkubationsschüttler bei 120 rpm inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden 8 ml TSB-

Medium stammabhängig mit verschiedenen Mengen angeimpft und für 2,5 h inkubiert (s. Tab. 2.7).

Tab. 2.7: Daten zur Kultivierung der Mikroorganismen im Radialdiffusionstest

| Art und Stamm | Volumen aus Übernachtskultur | Inkubation der Kultur bei 37°C | Volumen in 10 ml Underlay |
|---|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 | 50 µl | Standkultur | 50 µl |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 11446 | 50 µl | Standkultur | 50 µl |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | 100 µl | Standkultur | 100 µl |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 24433 | 200 µl | Schüttelkultur | 200 µl |

Die Underlay-Agarose wurde währenddessen vorbereitet (verflüssigt und auf 46°C abgekühlt) und die Petrischalen entsprechend beschriftet. Zu den je 10 ml Underlay-Agarose wurden die Bakteriensuspensionen gegeben, beides gut vermischt und in die Petrischalen gegossen. Der Ansatz kühlte für 15 min bei Raumtemperatur und 30 min im Kühlschrank ab. Mit einer Hautstanze wurden 3 mm große Löcher entsprechend der Rasterfelder auf den Petrischalen in den Underlay gestanzt und in diese je 5 µl der Testlösungen in unterschiedlichen Verdünnungen (1 µg/µl; unverdünnt, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100) gegeben, wobei die Proben in 0,01 % Essigsäure gelöst waren. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle diente 1:10 verdünntes humanes Lysozym (0,1 mg mit 100 µl 0,01 % Essigsäure gelöst, Sigma L 8405), als Negativkontrolle 0,01 % Essigsäure.

Die Overlay-Agarose wurde wie auch die Underlay-Agarose auf 46°C verflüssigt, abgekühlt und auf die Übernachtskultur gegossen. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 37°C für 3-4 h. Anschließend wurden die Hemmhöfe ausgemessen.

Wenn eine antimikrobielle Wirkung des Proteins vorliegt, lässt sich ein Hemmhof um die aufgetragene Lösung feststellen. Das bedeutet, dass die Bakterien sich nicht weiter vermehren können, gehemmt durch die zu testende Substanz. Die antimikrobielle Aktivität wird als minimale effektive Konzentration (MEK) angegeben, sobald die Proteine in zwei verschiedenen Konzentrationen Aktivität, bzw. Hemmhöfe zeigen. Der radiale Plattendiffusionstest wurde in Anlehnung an Steinberg und Lehrer durchgeführt (Steinberg und Lehrer, 1997).

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden N-terminalen Profilaggrin-Fragmente FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ rekombinant hergestellt, aufgereinigt und hinsichtlich antimikrobieller Eigenschaften untersucht.

3.1 Amplifikation und Ligation in den Klonierungsvektor pJet1.2

Als Matrize für die Amplifikation der beiden Fragmente FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ der B-Domäne des Profilaggrins diente das bereits hergestellte Plasmid PFLG-2 (s. Karsch, D., 2011), welches die kodierende Sequenz für FLG₁₂₃₋₂₀₀ enthielt und sich in der B-Domäne des Profilaggrins befindet. Die kodierende Sequenz wurde aus der cDNA von ausdifferenzierten humanen Keratinozyten generiert. Die cDNA-Sequenz des humanen Profilaggrins umfasst 12747 bp, die Protein-Sequenz 4061 Aminosäuren, abhängig von der Variante ob zehn, elf oder zwölf repeats vorliegen. Mit diesem Plasmid als Matrize wurden die beiden Fragmente mittels PCR amplifiziert (s. 2.11.1). Abb. 3.1 zeigt ein 1,2 %-iges Agarosegel mit stark leuchtenden Banden knapp unterhalb von 200 bp. Die amplifizierten Fragmente hatten eine Größe von 159 bp (FLG₁₄₆₋₁₉₉) bzw. 162 bp (FLG₁₄₆₋₂₀₀). Des Weiteren zeigte die Wasserkontrolle eine schwache Bande auf der gleichen Höhe wie das eigentliche Fragment (Spur 4).

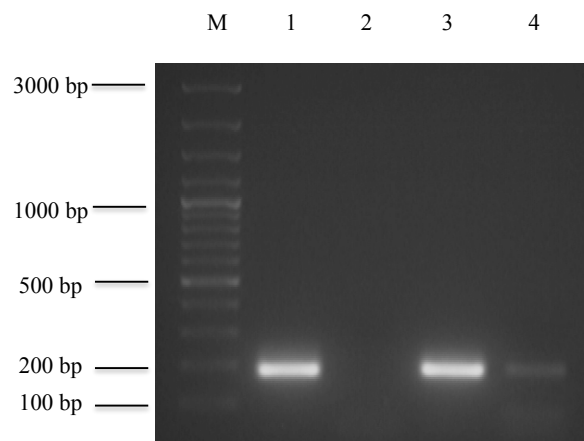


Abb. 3.1: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der mittels PCR amplifizierten Filaggrin-Fragmente. M: 100 bp Plus Größenstandard; Spur 1: FLG₁₄₆₋₁₉₉ (159 bp); Spur 3: FLG₁₄₆₋₂₀₀ (162 bp); Spur 2 und 4: Wasserkontrollen.

Im Anschluss an die Gelelektrophorese erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Gel mit dem GeneJET™ Gel Extraction Kit und die Ligation mit der T4 Ligase in den pJet1.2-Klonierungsvektor (s. 2.11.4).

3.2 Transformation in *Escherichia coli* XL1 blue-Zellen

Nach der Inkubation über Nacht wurden von den beiden Ligationsansätzen je 4 µl in die *Escherichia coli* XL1 blue-Zellen transformiert und nach einstündiger Inkubation auf LB-Nährböden, die die Antibiotika Tetracyclin und Ampicillin enthielten, ausplattiert. Um den Erfolg der Transformation zu bestätigen, erfolgte am nächsten Tag pro Filaggrin-Fragment mit einer zufälligen Auswahl von zehn Klonen aus dem Bakterienmaterial eine „Colony-Check-PCR“ (s. 2.11.1.2). Im 1,2 %-igen Agarosegel wurde gezeigt, dass die Bakterien den Vektor mit dem korrekten Insert aufgenommen hatten (s. Abb. 3.2). Für alle getesteten Klone war eine Bande bei ca. 300 bp zu erkennen. Die Primer (pJet1.2-Forward- bzw. Reverse-Sequencing-Primer) hatten eine Länge von 23 bp und 24 bp, die Fragmente 159 bp und 162 bp. Die Banden waren bei ca. 300 bp sichtbar, da zwischen den Bindungsstellen der beiden Primer noch weitere Basensequenzen liegen, die eine Gesamtlänge von 72 bp haben.

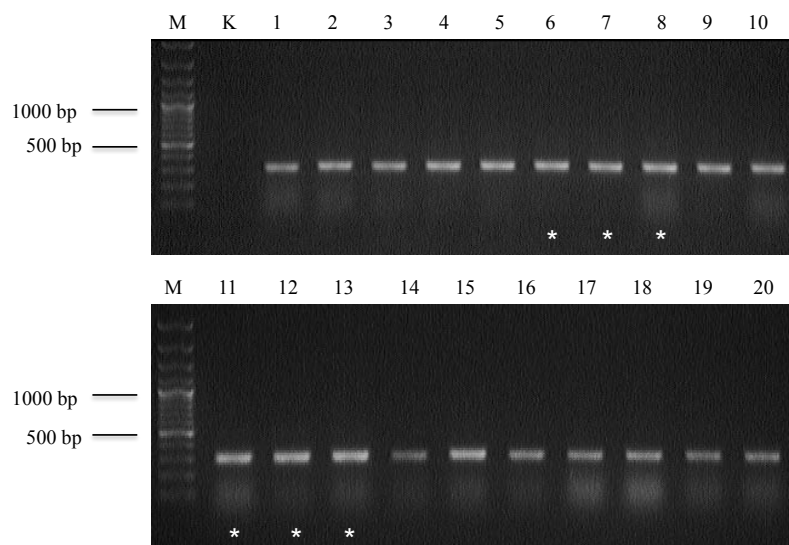


Abb. 3.2: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel einer „Colony-Check-PCR“ zur Überprüfung der Transformation des pJet1.2-Vektors mit den ligierten Fragmenten FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ in *Escherichia coli* XL1 blue-Zellen. Es wurden jeweils zehn Kolonien analysiert. M: 100 bp Plus Größenstandard; K: Wasserkontrolle; Spuren 1-10: Die Proben für FLG₁₄₆₋₁₉₉ sind alle positiv und zeigen Banden im Bereich von ungefähr 300 bp; Spuren 11-20: Die Proben für FLG₁₄₆₋₂₀₀ sind ebenfalls alle positiv und zeigen Banden im Bereich von 300 bp. Die Sternchen markieren die weiterverwendeten Klone.

Von den getesteten Einzelkolonien wurden pro Fragment jeweils drei Klone in 3 ml LB-Flüssigmedium aufgenommen, damit anschließend das Plasmid aus den Bakterien isoliert werden konnte (s. 2.11.6). Entsprechend der Resistenzen von Vektor und *Escherichia coli*-Zellen enthielt das Flüssigmedium die Antibiotika Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) und Tetracyclin (Endkonzentration 12,5 µg/ml). Die Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *SdaI* und *BamHI* hydrolysiert, sodass die Fragmente aus dem pJet1.2-Vektor wieder herausgeschnitten wurden, um sie anschließend in den pE-SUMO3-Expressionsvektor ligieren zu können. Abb. 3.3 zeigt die erfolgreiche Restriktionshydrolyse der beiden Filaggrin-Fragmente FLG₁₄₆₋₁₉₉ (Spur 1) und FLG₁₄₆₋₂₀₀ (Spur 2) mit Hilfe eines 1,5%-igen Agarosegels. Die geschnittenen Fragmente lassen sich durch die Bande bei ca. 200 bp nachweisen. Die stark leuchtende Bande in Spur 1 bzw. Spur 2 bei ca. 3000 bp stellt den linearisierten pJet1.2-Vektor dar. Die anderen sichtbaren Banden zeigen noch ungeschnittenes Plasmid.

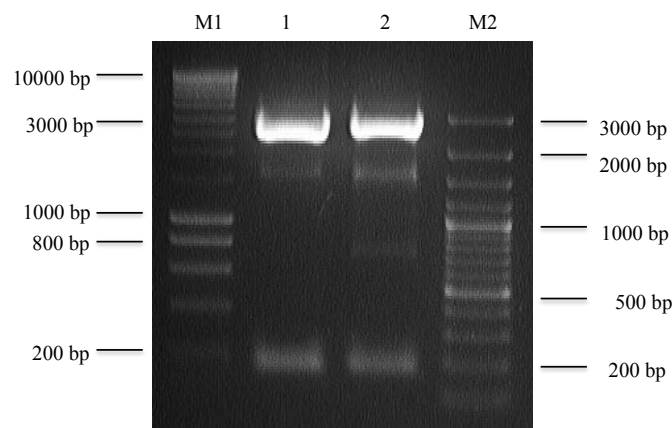


Abb. 3.3: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Restriktionshydrolyse mit *BamHI* und *SdaI*. Größenstandards: M1: Smart Ladder; M2: Gene Ruler. Spur 1: FLG₁₄₆₋₁₉₉ (159 bp) bei ca. 200 bp; Spur 2: FLG₁₄₆₋₂₀₀ (162 bp) bei ca. 200 bp. Die in Spur 1 und 2 leuchtenden Banden bei ungefähr 3000 bp entsprechen dem linearisierten pJet1.2-Vektor.

3.3 Ligation in den Expressionsvektor und Transformation in *Escherichia coli* DH5 alpha-Zellen

Für die anschließende Expression wurden die Filaggrin-Fragmente in den Expressionsvektor pE-SUMO3 ligiert (T4 Ligase 1 U/ µl) und anschließend je 2,5 µl Ligationsansatz in

Escherichia coli DH5 alpha-Zellen transformiert (s. 2.11.5.2). Nach einstündiger Inkubation wurden die Ansätze auf LB-Nährböden, die mit dem Antibiotikum Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) versetzt wurden, ausplattiert. Am nächsten Tag fand eine Überprüfung von zehn zufällig ausgewählten Einzelkolonien pro Fragment mittels „Colony-Check-PCR“ auf den korrekten Vektor und Insert statt. Im 1 %-igen Kontrollgel konnte gezeigt werden, dass alle analysierten Klone den Vektor mit Insert aufgenommen hatten, die Banden liefen bei ca 300 bp.

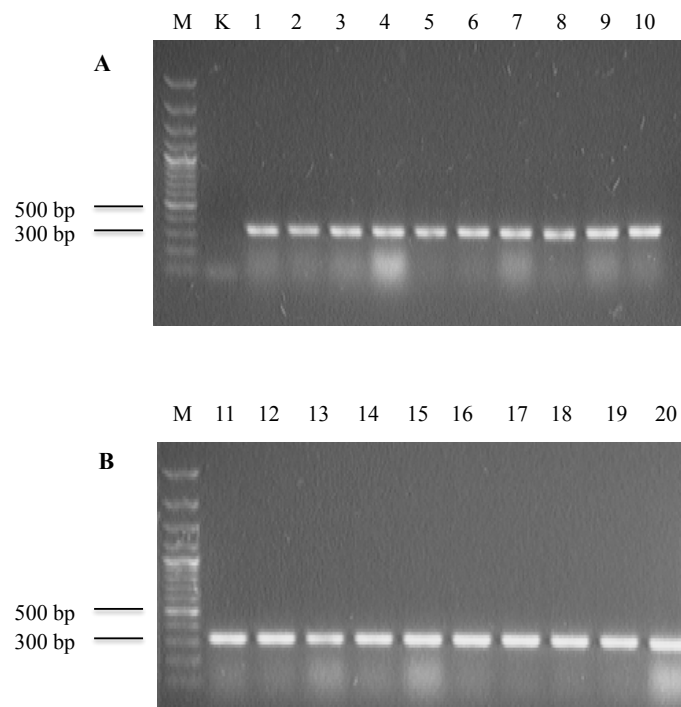


Abb. 3.4: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel einer „Colony-Check-PCR“ zur Überprüfung der Transformation des pE-SUMO3-Vektors mit ligierten Filaggrin-Fragmenten in die *Escherichia coli* DH5-alpha-Zellen. A: pE-SUMO3-Vektoren mit FLG₁₄₆₋₁₉₉-Insert; B: pE-SUMO3-Vektoren mit FLG₁₄₆₋₂₀₀-Insert. M: 100 bp Plus Größenstandard; K: Wasserkontrolle; Spur 1-10: Alle Proben sind positiv und zeigen Banden im Bereich von 300 bp (FLG₁₄₆₋₁₉₉); Spur 11-20: Alle Proben sind positiv und zeigen Banden im Bereich von 300 bp (FLG₁₄₆₋₂₀₀).

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Ligation erfolgte parallel zur Transformation eine PCR auf den Ligationsansatz (s. 2.11.1.1). Im 1,5 %-igen Kontrollgel konnte gezeigt werden, dass die Inserts im zirkulären Vektor vorlagen, die Banden konnten bei ungefähr 420 bp (von Schnittstelle *SdaI* bis Schnittstelle *BamHI* des Inserts) nachgewiesen werden (s. Abb. 3.5).

Als Kontrolle diente der zirkuläre pE-SUMO3-Vektor, der von den Ansatzstellen der Primer T7-Reverse bis T7-Promotor-long bei ungefähr 570 bp lief.

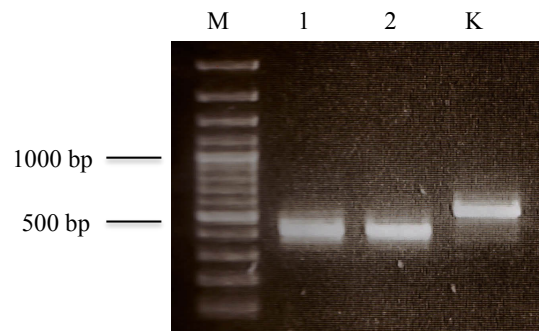


Abb. 3.5: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der PCR zur Überprüfung der Ligation der Inserts in den pE-SUMO3-Vektor. M: 100 bp Plus Größenstandard; Spur 1 (FLG₁₄₆₋₁₉₉) und Spur 2 (FLG₁₄₆₋₂₀₀) zeigen deutliche Banden bei ungefähr 420 bp; Spur K: Positivkontrolle mit zirkulärem pE-SUMO3-Vektor ohne Insert als Template bei ungefähr 570 bp.

3.4 Transformation in die Expressionszellen *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS*

Von den getesteten Einzelkolonien nach Plasmidisolierung erfolgte auch hier wieder die Aufnahme der drei jeweils willkürlich ausgewählten Klone in 3 ml LB-Flüssigmedium, sowie die Inkubation und anschließende Isolierung der Plasmide aus den Bakterien. Das Flüssigmedium wurde hier mit den beiden Antibiotika Chloramphenicol und Kanamycin versetzt. Die ausgewählten Plasmide wurden für die Sequenzierung vorbereitet und nach Überprüfung der korrekten Sequenz wurde je ein ausgewähltes Plasmid pro Fragment in die Expressionszellen *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS* transformiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze auf den LB-Nährböden, die ebenfalls die Antibiotika Kanamycin und Chloramphenicol enthielten, ausplattiert (s. 2.11.5.3).

Mit Hilfe einer „Colony-Check-PCR“ wurde die Transformation der Filaggrin-Fragmente in die Expressionszellen von jeweils drei Einzelkolonien überprüft (s. Abb. 3.6). Die erfolgreiche Aufnahme des Plasmids wurde sowohl für FLG₁₄₆₋₁₉₉ (Spur 1-3) als auch für FLG₁₄₆₋₂₀₀ (Spur 4-6) durch eine stark leuchtende Bande bei ca. 300 bp nachgewiesen.

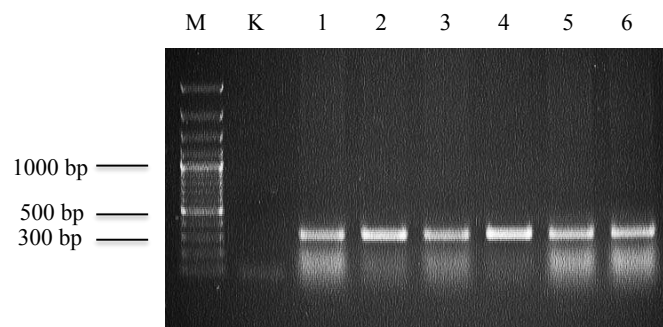


Abb. 3.6: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der „Colony-Check-PCR“ zur Überprüfung der Transformation der Plasmide mit den Inserts in die *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS*-Zellen. M: 100 bp Plus Größenstandard; K: Wasserkontrolle; Spuren 1-3: Die Proben sind positiv und zeigen Banden bei ungefähr 300 bp (FLG₁₄₆₋₁₉₉); Spuren 4-6: Die Proben sind positiv und zeigen Banden bei ungefähr 300 bp (FLG₁₄₆₋₂₀₀).

3.5 Expression und Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine

Die Expression der rekombinanten Fusionsproteine erfolgte nach Induktion mit 1 mM IPTG in den *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS*-Zellen (s. 2.12.3). Um das Fusionsprotein zu isolieren, wurden die Bakterien mit Ultraschall für 5 min (15 s Ultraschall und 30 s Inkubation auf Eis im Wechsel) lysiert und anschließend zentrifugiert, um eine Trennung des Lysats in Überstand und Zellpellet zu erreichen (s. 2.13.1).

Die nach Zentrifugation im Überstand befindlichen Proteine wurden im ersten Aufreinigungsschritt auf die IMAC aufgetragen. Hierbei binden die His-Tags vorübergehend an die Nickelionen der Säulenmatrix, sodass die ungebundenen Proteine von dem Fusionsprotein getrennt werden. Anschließend wurde von den eluierten Proben die Konzentration im Photometer gemessen. Diese Konzentration muss bekannt sein, um im nächsten Aufreinigungsschritt die Bindungskapazität der C-18-HPLC-Säule nicht zu überschreiten. Die Konzentration sollte nicht mehr als 1 mg Protein pro Lauf betragen.

Um das Vorhandensein der beiden Fusionsproteine zu überprüfen, wurden die Proben aus der IMAC zunächst mit der C18-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt. Abb. 3.7 zeigt das Chromatogramm für FLG₁₄₆₋₂₀₀.

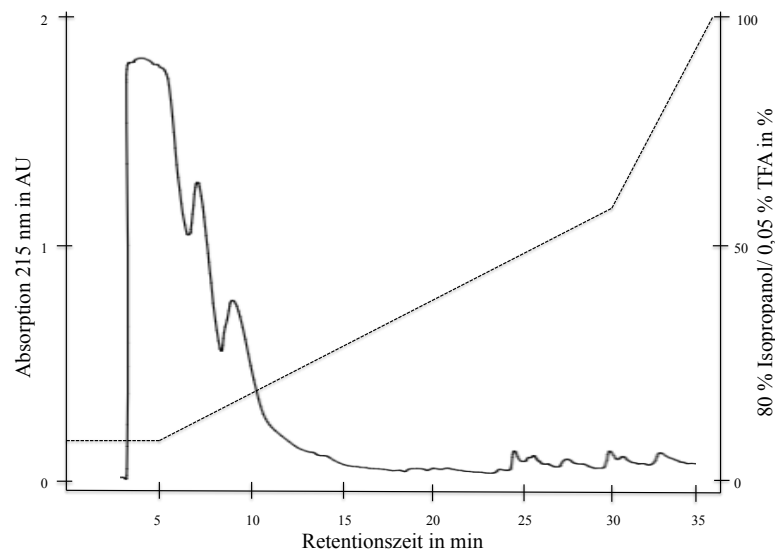


Abb. 3.7: Repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung des rekombinant exprimierten Fusionsproteins FLG₁₄₆₋₂₀₀ mittels C18-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption bei 215 nm zum Gradientenverlauf (gestrichelte Linie). Die Konzentration des Eluenten ist rechts in Prozent aufgetragen. Die zuvor über die IMAC aufgereinigte Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 2,5 ml/ min auf die C18-Säule aufgetragen und mit 80 % Isopropanol/ 0,05 % TFA eluiert. Es konnte keine Trennung der Fusionsproteine erreicht werden.

Mit der Annahme, dass sich die Fusionsproteine im Durchlauf befinden und unter den getesteten Bedingungen nicht an der Säule gebunden wurden, wurden erneut die Proben aus der IMAC mit der C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt.

In Abb. 3.8 ist repräsentativ das Chromatogramm der C4-Umkehrphasen-HPLC für FLG₁₄₆₋₁₉₉ dargestellt. Bei einer Retentionszeit (RT) von 5-10 min ist deutlich der Peak der im IMAC-Elutionspuffer enthaltenden Salze zu sehen, die nicht an die Säule binden und sich im Durchlauf befinden. Für das Fusionsprotein FLG₁₄₆₋₁₉₉ lag die RT bei 18,6 min, für FLG₁₄₆₋₂₀₀ bei 18,2 min. Der Peak der Fraktion, in der sich das eluierte Fusionsprotein FLG₁₄₆₋₁₉₉ befand, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

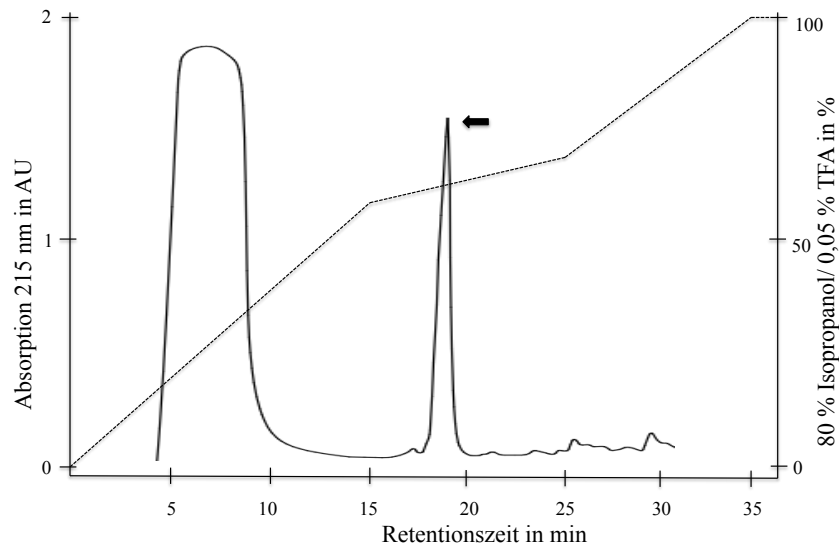


Abb. 3.8: Repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung des rekombinant exprimierten Fusionsproteins FLG₁₄₆₋₁₉₉ mittels C4-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption bei 215 nm zum Gradientenverlauf (gestrichelte Linie). Die Konzentration des Eluenten ist rechts in Prozent aufgetragen. Die zuvor über die IMAC aufgereinigte Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/ min auf die C4-Säule aufgetragen und mit 80 % Isopropanol/ 0,05 % TFA eluiert. Der Pfeil markiert den Peak der Fraktion mit dem Fusionsprotein FLG₁₄₆₋₁₉₉.

Zur Überprüfung der korrekten Masse der aufgereinigten Fusionsproteine, erfolgte eine massenspektrometrische Analyse (s. 2.13.6). Diese zeigte für das Fusionsprotein FLG₁₄₆₋₁₉₉ eine Masse von 7907,0 Da. Beim Vergleich mit der theoretisch ermittelten Masse von 7907,5 Da kann davon ausgegangen werden, dass es sich um das Fusionsprotein handelte (s. Abb. 3.9 und Abb. 3.10). Die massenspektrometrische Analyse zeigte neben dem Peak für das Fusionsprotein noch zwei weitere Peaks mit einer Massendifferenz von +178,0 Da und zum anderen der Peak mit +258,5 Da. Für das Fusionsprotein FLG₁₄₆₋₂₀₀ ergab die Messung eine Masse von 8020,0 Da, die theoretisch ermittelte liegt bei 8020,6 Da. Hier wurden ebenfalls zwei weitere Peaks mit +178,1 Da und +258,0 Da gemessen. Der Hauptpeak ist nicht wie für das FLG₁₄₆₋₁₉₉ der des eigentlichen Fusionsproteins, sondern der 178,1 Da größere.

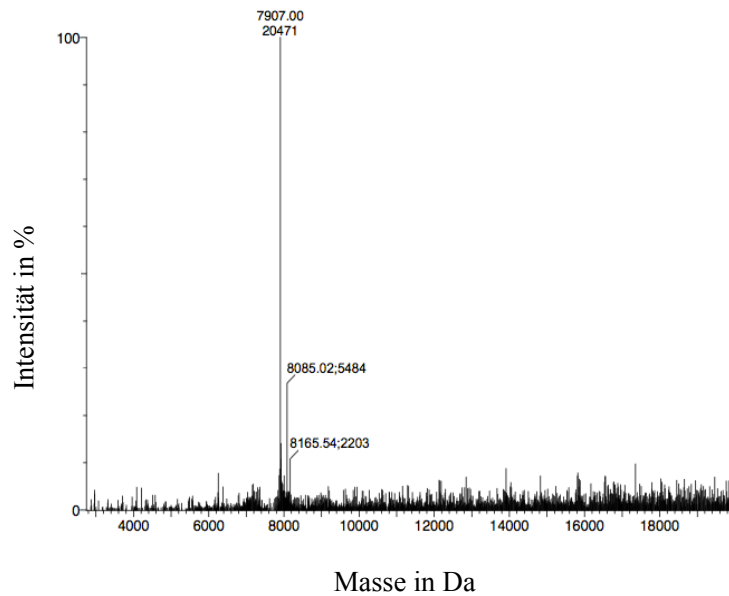


Abb. 3.9: Massenbestimmung des FLG₁₄₆₋₁₉₉-Fusionsproteins mittels ESI-MS. Gezeigt ist die „MaxEnt1“-Auswertung im Anschluss an die mit der C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigten Fragmente. Die Masse in Dalton ist gegenüber der Intensität in % aufgetragen. Die theoretisch berechnete Masse für das Fusionsprotein FLG₁₄₆₋₁₉₉ beträgt 7907,5 Da.

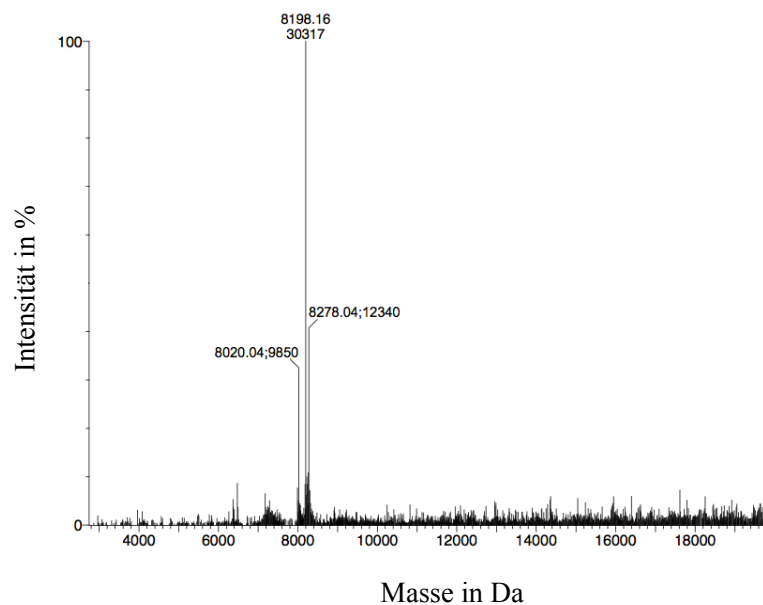


Abb. 3.10: Massenbestimmung des FLG₁₄₆₋₂₀₀-Fusionsproteins mittels ESI-MS. Gezeigt ist die „MaxEnt1“-Auswertung im Anschluss an die mit der C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigten Fragmente. Die Masse in Dalton ist gegenüber der Intensität in % aufgetragen. Die theoretisch berechnete Masse für das Fusionsprotein FLG₁₄₆₋₂₀₀ beträgt 8020,6 Da.

Da die beiden Fusionsproteine in den HPLC-Läufen nachgewiesen werden konnten, wurden die verbliebenen Eluate aus der IMAC mittels Größenausschlusschromatografie aufgereinigt

(s. 2.13.2). Im Anschluss daran wurde die Abspaltung des Fusionstags mit Bromcyan durchgeführt.

3.5.1 Abspaltung des Fusionstags mit Bromcyan

Zum Abspalten des Fusionstags wurden die beiden Fusionsproteine mit Bromcyan versetzt und somit der Tag nach dem einzigen Methionin in der Aminosäuresequenz abgespalten (s. 2.13.5). Daraufhin wurde erneut eine C18-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt, um das Protein vom abgespaltenen Tag und ungespaltenem Fusionsprotein zu trennen. Abb. 3.11 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm der Aufreinigung der Bromcyan-Spaltung für das FLG₁₄₆₋₁₉₉, welches bei einer Retentionszeit (RT) von 13,92 min eluiert wurde (Pfeil). Hier konnte nicht jeder Peak exakt voneinander getrennt aufgefangen werden. Der Peak bei der Retentionszeit von 15,00 min gehört zu dem Fusionsprotein, was sich offensichtlich nicht durch Bromcyan spalten ließ. Für das FLG₁₄₆₋₂₀₀-Protein lag die RT bei 14,98 min. Auch hier waren die Fraktionen nur schwer voneinander zu trennen. Die RT von 15,75 min wurde dem ungespaltenem Fusionsprotein von FLG₁₄₆₋₂₀₀ zugeordnet.

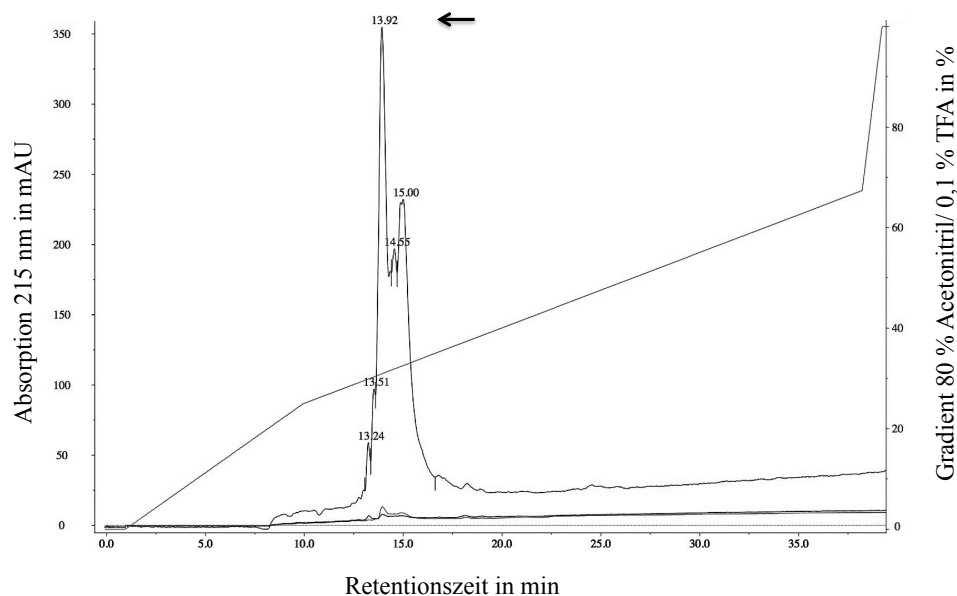


Abb. 3.11: Repräsentatives Chromatogramm der Aufreinigung des mit Bromcyan behandelten Fusionsproteins FLG₁₄₆₋₁₉₉ mittels C18-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption bei 215 nm in mAU zum Gradientenverlauf. Rechts ist die Konzentration des Eluenten in Prozent aufgetragen. Die Probe wurde mit einer Flussrate von 0,15 ml/ min auf die Säule aufgetragen und mit 80 % Acetonitril/ 0,1 % TFA eluiert. Der Pfeil markiert den Peak der Fraktion mit dem Protein FLG₁₄₆₋₁₉₉.

Nach der Spaltung wurden im MS erneut die Massen überprüft (s. Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Für das Protein FLG₁₄₆₋₁₉₉ ergab die Messung eine Masse von 6381,9 Da (theoretischer Wert 6381,8 Da). Im MS konnte das Fusionsprotein weiterhin nachgewiesen werden. Hier zeigte sich erneut, wie auch schon bei der ersten Messung für das Fusionsprotein (s. Abb. 3.9 und Abb. 3.10), ein weiterer Peak, der eine Differenz von +178,0 Da aufwies. Das Protein FLG₁₄₆₋₂₀₀ hatte eine Masse von 6494,7 Da (theoretisch 6495,0 Da). Hier war ebenfalls das Fusionsprotein noch nachweisbar, auch die beiden weiteren aus der ersten Messung bekannten Massen konnten nachgewiesen werden: ein Peak mit einer Massendifferenz zum Fusionsprotein von +178,1 Da, ein weiterer mit einer Differenz von +258,0 Da. In der Messung der Proteine nach Spaltung wurden keine zusätzlichen Massendifferenzen in dieser Größenordnung detektiert. Die Massendifferenzen wurden lediglich für die Fusionsproteine gemessen.

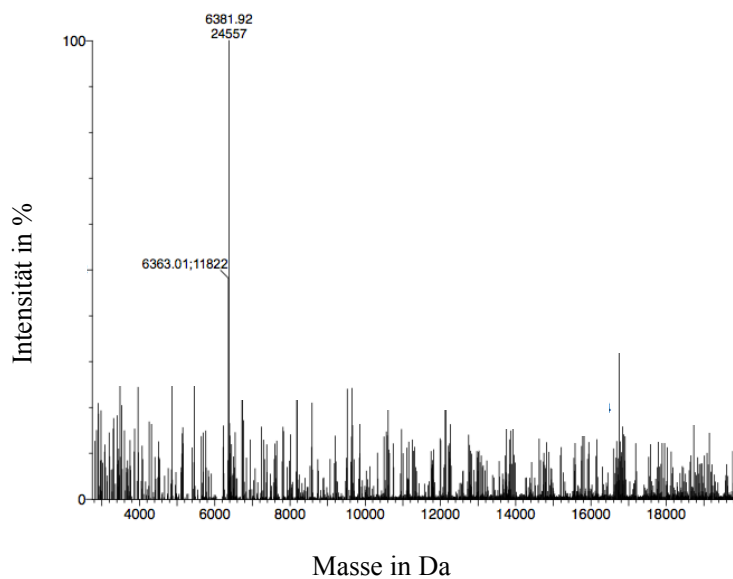


Abb. 3.12: Massenbestimmung des FLG₁₄₆₋₁₉₉-Proteins mittels MS. Gezeigt ist die „MaxEnt1“-Auswertung im Anschluss an die mit der C18-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigten Proteine. Die Masse in Dalton ist gegenüber der Intensität in % aufgetragen. Die theoretisch berechnete Masse für das Protein FLG₁₄₆₋₁₉₉ beträgt 6381,8 Da.

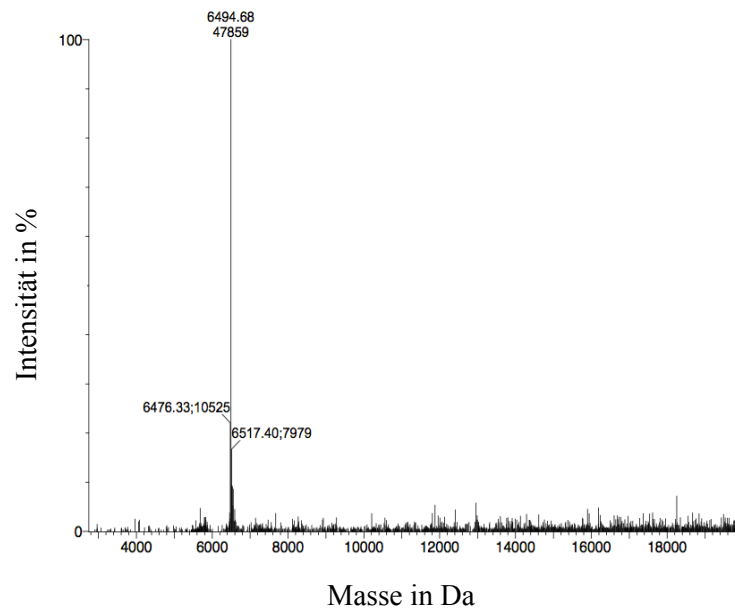


Abb. 3.13: Massenbestimmung des FLG₁₄₆₋₂₀₀-Proteins mittels MS. Gezeigt ist die „MaxEnt1“-Auswertung im Anschluss an die mit der C18-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigten Proteine. Die Masse in Dalton ist gegenüber der Intensität in % aufgetragen. Die theoretisch berechnete Masse für das Protein FLG₁₄₆₋₂₀₀ 6495,0 Da.

Nur die nach MS-Kontrolle ausgewählten HPLC-Fractionen, welche die gewünschten Proteine nach Spaltung enthielten, wurden anschließend in die antimikrobielle Testung gegeben (s. 3.6).

In der Abb. 3.14 ist am Beispiel des FLG₁₄₆₋₂₀₀ eine Übersicht der verschiedenen Schritte der Proteinexpression und Aufreinigung in einer SDS-PAGE-Gelelektrophorese dargestellt (s. 2.13.7). Spur 1 zeigt die Gesamtproteine der *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS*-Zellen vor Induktion mit 1 mM IPTG, Spur 2 die Gesamtproteine der *Escherichia coli* 3h nach Induktion. Das Fusionsprotein ist in Spur 2 bei ca 15 kDa zu erkennen und läuft somit viel höher als die eigentlich gemessene Masse (8020 Da). Spur 3 und 4 zeigen das Fusionsprotein nach Aufreinigung durch die C4-Umkehrphasen-HPLC in zwei verschiedenen Konzentrationen (Spur 3: 250 ng; Spur 4: 500 ng). Spur 5 und 6 zeigen je sehr schwach angefärbte Banden des Proteins FLG₁₄₆₋₂₀₀ nach Spaltung mit Bromcyan und Aufreinigung durch die C18-Umkehrphasen-HPLC (Spur 5: 50 µg; Spur 6: 60 µg). Die Banden laufen ebenfalls viel höher, als die Masse es erwarten lässt (6495 Da). Zusätzlich sieht man noch unverdautes Fusionsprotein.

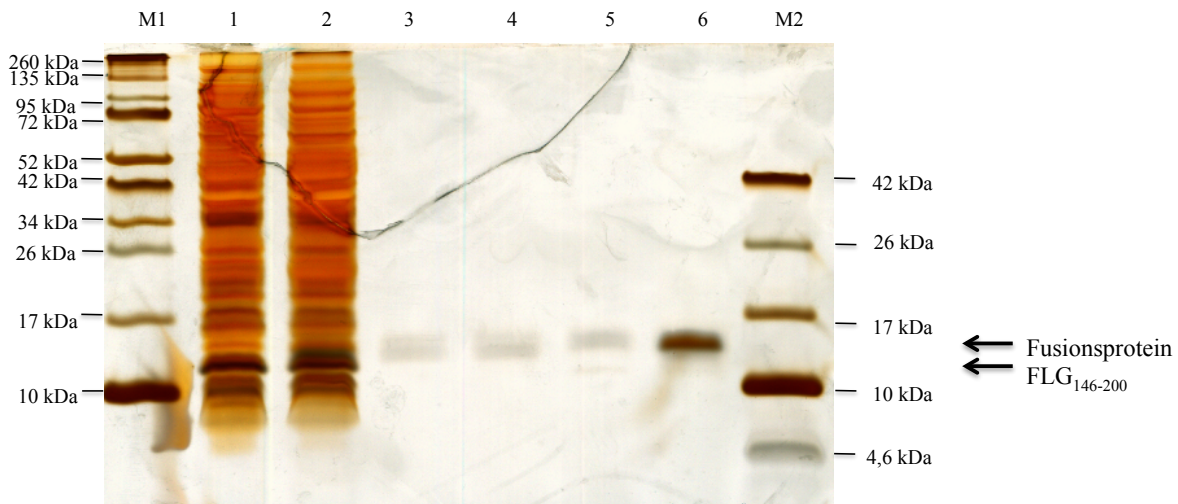


Abb. 3.14: Silber-gefärbte SDS-PAGE von verschiedenen Herstellungs- und Aufreinigungsschritten des FLG₁₄₆₋₂₀₀. Größenstandard M1: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder; M2: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder (Fermentas): Spur 1: *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS*-Zellen vor Induktion mit 1 mM IPTG. Spur 2: *Escherichia coli* 3h nach Induktion mit 1 mM IPTG. Spur 3 und 4: Fusionsprotein nach Aufreinigung durch die C4-Umkehrphasen-HPLC (250 ng bzw 500 ng). Spur 5 und 6: FLG₁₄₆₋₂₀₀-Protein nach Spaltung mit Bromcyan und Aufreinigung durch die C18-Umkehrphasen-HPLC (50 µg bzw 60 µg).

3.6 Austestung der antimikrobielle Aktivität im radialen Plattendiffusionstest

Nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung der rekombinant hergestellten Profilaggrin-Proteine FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ wurden diese mit Hilfe des radialen Plattendiffusionstests auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht (s. 2.14).

Die verwendeten Agaroseplatten enthielten jeweils die zur Testung benutzten Mikroorganismen: den gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die beiden gram-negativen Bakterienstämme *Escherichia coli* ATCC 11775 und *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 11446, sowie die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433. In die in die Agarose gestanzten Löcher (Durchmesser 3 mm) wurden die entsprechenden Proteinmengen in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen (unverdünnt, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100), um eine Auskunft über die Wirkschwelle des jeweiligen Proteins zu erhalten. Unverdünnt entsprach dabei der Konzentration von 1 µg/µl. Als Positivkontrolle diente Lysozym (100 ng/µl). Als Negativkontrolle wurde 0,01% Essigsäure eingesetzt. Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Im radialen Plattendiffusionstest zeigten sich für FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ gegen keinen der vier getesteten Organismen antimikrobielle Aktivität. In keiner Verdünnungsstufe konnte ein Hemmhof gemessen werden, Hemmhöfe zeigten sich lediglich bei der Positivkontrolle mit Lysozym.

Auffällig war, dass das sich auf den Platten mit *Pseudomonas aeruginosa* ein verstärktes Wachstum um das Stanzloch abgrenzte.

Tabelle 3.1: Ergebnisse des Radialdiffusionstests für FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀

| Verdünnung FLG ₁₄₆₋₁₉₉ | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | | <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 | | <i>Candida albicans</i> ATCC 24433 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 11446 | |
|--------------------------------------|---|---|---------------------------------------|---|---------------------------------------|----|---|------|
| 1 µg/µl | H | B | H | B | H | B | H | B |
| 1:1 | kH | | kH | | kH | | kH | 11,5 |
| 1:3 | kH | | kH | | kH | | kH | 9,5 |
| 1:10 | kH | | kH | | kH | | kH | 8 |
| 1:30 | kH | | kH | | kH | | kH | 7 |
| 1:100 | kH | | kH | | kH | | kH | 6 |
| Pos. K. | 6 | | 5,5 | | 6,5 | HH | 7 | HH |

| Verdünnung FLG ₁₄₆₋₂₀₀ | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | | <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 | | <i>Candida albicans</i> ATCC 24433 | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 11446 | |
|--------------------------------------|---|---|---------------------------------------|---|---------------------------------------|----|---|-----|
| 1 µg/µl | H | B | H | B | H | B | H | B |
| 1:1 | kH | | kH | | kH | | kH | 11 |
| 1:3 | kH | | kH | | kH | | kH | 9,5 |
| 1:10 | kH | | kH | | kH | | kH | 8,5 |
| 1:30 | kH | | kH | | kH | | kH | 7,5 |
| 1:100 | kH | | kH | | kH | | kH | 6,5 |
| Pos. K. | 6 | | 5,5 | | 6,5 | HH | 7 | HH |

H: Hemmhof in mm; B: Bewertung (bei nicht vorhandenen Hemmhöfen nicht möglich); kH: kein Hemmhof abgrenzbar; HH: abgrenzbarer Hemmhof, geringes Wachstum im Hemmhof; Durchmesser in mm; pos. K.: Positivkontrolle, Humanes Lysozym (100 ng/µl); kursiv gedruckte Zahlen: Durchmesser des verstärkten Wachstums um Stanze; rote Zahlen: keine klaren Hemmhöfe.

4 Diskussion

Die Haut ist als äußere Begrenzung zur Umwelt einer Vielzahl von Einflüssen ausgesetzt. Damit es nicht zu einer Infektion durch Eindringen von pathogenen Mikroorganismen in die Haut kommt, haben sich verschiedenste Schutz- und Abwehrmechanismen entwickelt, die die Erreger daran hindern, ihre pathogenen Eigenschaften entfalten zu können. Zu der angeborenen Immunabwehr gehören auch die antimikrobiellen Peptide (AMPs), die als überwiegend kationische Proteine beschrieben werden (Hancock und Diamond, 2000). Sie lassen sich bei Wirbeltieren in vier Hauptgruppen unterteilen: Defensine, Ribonukleasen, Cathelicidine und S100-Proteine. Durch chemotaktische Eigenschaften einiger AMPs (z.B. hBD-2) wird eine Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem hergestellt (Braff *et al.*, 2005).

Seit vielen Jahren besteht bereits das Problem der zunehmenden Resistenzentwicklung gegen herkömmliche Antibiotika in der Behandlung von Infektionen. Dabei umgehen die Erreger zum Teil die Wirkmechanismen der verschiedenen Antibiotikaklassen. Es ist bereits seit Jahren Gegenstand der Forschung, neue Antibiotika und Ansätze zu finden, um eine weitere Verbreitung der Erreger zu minimieren.

Untersuchungen von Proteinextrakten des *Stratum corneums* zeigten nach Auftrennung durch HPLC-Analysen neben Hornerin- und Filaggrin-1- auch Profilaggrin-Peptide, die antimikrobielle Eigenschaften aufwiesen. Diese Peptide konnten der N-terminalen Region in der B-Domäne des Profilaggrins zugeordnet werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits mehrere N-terminale Teilsequenzen von Profilaggrin hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität untersucht, um die ursächlichen Teilstücke für die antimikrobielle Aktivität zu finden. Tab. 4.1 zeigt eine Übersicht der getesteten Fragmente. Dabei war ein Abschnitt gegen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* aktiv (Schulz, 2010) und ein weiterer gegen die drei Keime und *Pseudomonas aeruginosa* (Karsch, 2011). Zwei weitere Abschnitte aus der Repeat-Region des Profilaggrins (FLG₇₆₄₋₉₀₃ und FLG₂₈₄₉₋₂₉₀₀) zeigten ebenfalls antimikrobielle Aktivität (Schmidt, 2012). Auch ein Abschnitt des C-Terminus des Profilaggrins (FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉) wurde Tests unterzogen, es konnte jedoch keine Aktivität nachgewiesen werden (Babian, 2010).

Tab. 4.1: Bisher getestete Filaggrin-Fragmente bezüglich antimikrobieller Aktivität

| | | pI-Werte | Antimikrobielle Aktivität gegen |
|---|--|----------|---|
| Antimikrobielle Aktivität | FLG ₈₇₋₁₉₇ (D. Karsch) | 10,19 | <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i> <i>Staphylococcus aureus</i> |
| | FLG ₁₂₃₋₂₀₀ (C. Schulz) | 10,71 | <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> |
| | FLG ₇₆₄₋₉₀₃ (A. Schmidt) | 11,44 | <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i> |
| | FLG ₂₈₄₉₋₂₉₀₀ (A. Schmidt) | 7,21 | <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| Fehlende antimikrobielle Aktivität | FLG ₈₇₋₁₂₂ (C. Schulz) | 8,46 | |
| | FLG ₉₁₋₁₂₂ (D. Karsch) | 8,38 | |
| | FLG ₁₄₆₋₁₉₉ (B. Laudénbach) | 9,85 | |
| | FLG ₁₄₆₋₂₀₀ (B. Laudénbach) | 9,85 | |
| | FLG ₁₆₂₋₂₀₇ (K. Garske) | 9,63 | |
| | FLG ₁₆₂₋₁₈₄ (K. Garske) | 9,31 | |
| | FLG ₁₇₆₋₂₀₇ (K. Garske) | 9,99 | |
| | FLG ₃₆₀₅₋₃₈₇₉ (S. Babian) | 7,49 | |

In dieser Arbeit wurden zwei weitere Fragmente des Profilaggrins in der B-Domäne, FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ untersucht, die sich in ihrer Länge lediglich um eine Aminosäure unterscheiden. Abb. 4.1 zeigt die Aminosäuresequenz des N-Terminus von Profilaggrin, der in die A- und B-Domäne unterteilt werden kann. Die Sequenzen für die in dieser Arbeit getesteten FLG-Fragmente sind farblich markiert. Für diese beiden Fragmente kam je ein verkürzter SUMO-Tag bestehend aus einem Hexahistidin-Tag und fünf weiteren Aminosäuren zum Einsatz. Zwischen der kodierenden Sequenz des Tags und der des Proteins wurde die Aminosäure Methionin als Schnittstelle für die chemische Bromcyanspaltung hinzugefügt. Bromcyan ist als Derivat der Blausäure in der Lage, C-terminal, unabhängig vom Fusionstag, von der Aminosäure Methionin zu spalten. Diese Methode gilt als hochspezifisch mit einer Spaltungsrate von 90-100% (Andreev *et al.*, 2010). Allerdings darf dabei das Protein selbst kein weiteres Methionin enthalten, da sonst unerwünschte Spaltprodukte innerhalb des Proteins entstehen.

| | | |
|---------|---|-----------------|
| 1-81 | MSTLLENIFAIINLQYYSKKDKNTDTLSKKELKELLEKEFRQILKNPDDPD MVDVFMHLDIDHNKKIDFTEFLLMVFKL | A-Domäne |
| 82-100 | AQAYYESTRKENLPISGHK | B-Domäne |
| 101-150 | HRKHSHHDKHEDNKQEENKENRKRPSLERRNNRKGNGRSKSPRETGGK | |
| 151-200 | RHESSEKKERKGYSPTHREEEYGKNHHNSSKKEKNKTENTRLGDNRKRL | |
| 201-293 | SERLEEKEDNEEGVYDYENTGRMTQKWIQSGHIATYYTIQDEAYDTTDSLLE ENKIYERSRSSDGKSSSQVNRSRHENTSQVPLQESRTRKRR | |

Abb. 4.1: Aminosäuresequenz des N-Terminus von Profilaggrin. Der insgesamt 293 Aminosäuren umfassende N-Terminus lässt sich in eine A-Domäne, bestehend aus 81 Aminosäuren, und eine B-Domäne, bestehend aus 212 Aminosäuren, unterteilen. Rot unterstrichen ist die Sequenz von FLG₁₄₆₋₂₀₀, blau unterstrichen die Sequenz von FLG₁₄₆₋₁₉₉.

4.1 Herstellung der Fusionsproteine

Bei der Suche nach den ursächlichen Teilsequenzen des Profilaggrin-Gens, die in den HPLC-Analysen antimikrobielle Aktivität aufwiesen, wurden die Fragmente FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ rekombinant als Fusionsprotein in *Escherichia coli* hergestellt. Die Produktion in *Escherichia coli* gestaltet sich als effizient und einfach (Sambrook, Fritsch und Maniatis, 1982). Trotzdem gab es in der Vergangenheit immer wieder Probleme in der Verwendung der *Escherichia coli*-Bakterien, da die Expression vieler AMPs scheiterte. Als mögliche Ursache wurde eine erhöhte antimikrobielle Aktivität der Peptide gegenüber den *Escherichia coli*-Bakterien angenommen (Valore und Ganz, 1997). In dieser Arbeit wurde das pE-SUMO3-Vektorsystem verwendet, in dem die Proteine zunächst als Fusionsproteine hergestellt wurden. Vorteile dieses Systems sind eine höhere Proteinsynthese und die Aufreinigung über eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie. Außerdem ist mit diesem Verfahren die antimikrobielle Aktivität der Proteine zunächst herabgesetzt, sodass diese nicht wirksam gegenüber den *Escherichia coli*-Bakterien sind. Ein angehängter Fusionstag setzt eine mögliche antimikrobielle Aktivität gegenüber diesen herab. Ein Nachteil des Systems ist, dass der Fusionstag in einem weiteren Schritt abgespalten werden muss, sodass es hier zu einem potentiellen Materialverlust kommen kann (Butt *et al.*, 2005).

Bei der Herstellung der Fusionsproteine sowie der Proteine traten Besonderheiten auf, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Die Ligation beider Fragmente in den linearisierten pJet1.2-Klonierungsvektor sowie die anschließende Transformation in die *Escherichia coli* XL1 blue-Zellen gestaltete sich ohne

Schwierigkeiten. Nach Herausschneiden der Fragmente wurden diese in den pE-SUMO3-Expressionsvektor ligiert. In der anschließenden Transformation in die *Escherichia coli* XL1-blue-Zellen wuchsen keine Klone auf den Agarplatten. Die Optimierung der Versuchsbedingungen brachte ebenfalls keinen Erfolg: die auszuplattierende Menge von 500 µl auf einer Agarplatte wurde auf zwei Agarplatten verteilt, um den Klonen mehr Platz zum Wachsen zu geben. Ebenfalls wurde die Geschwindigkeit bei der SOC-Medium-Zugabe verändert, sodass das Medium nun zügiger mit den Bakterien vermischt wurde. Beides brachte nicht den gewünschten Erfolg. Auch das zusätzliche Zentrifugieren und Resuspendieren im SOC-Medium im Anschluss an die Inkubation nach der regulären SOC-Medium-Zugabe erhöhte nicht die Anzahl der Klone. Mögliche Gründe dafür können vielfältig sein. Die Agarplatten könnten noch zu kalt gewesen sein, nachdem sie aus dem Kühlschrank geholt wurden. Kalte Platten vermindern die Effizienz der Transformation. Ein weiterer Grund können die *Escherichia coli*-Bakterien selbst gewesen sein. In der Regel werden sie bei -80°C gelagert. Sie könnten durch häufiges Auftauen und Einfrieren bereits vor der Transformation zerstört worden sein. Auch zu schnelles Auftauen oder fehlende Lagerung auf Eis während des Auftauens verringert die Transformationseffizienz. Dieser Grund ist allerdings unwahrscheinlich, da dieselben Bakterien auch in der Transformation mit dem pJet1.2-Vektor verwendet wurden. Des Weiteren könnte man den pE-SUMO3-Vektor betrachten. Dieser Vektor ist mit 5610 bp relativ groß. Im Vergleich dazu besteht der pJet1.2-Vektor aus lediglich 2974 bp. Ein weiterer Grund für die fehlgeschlagene Transformation könnte sein, dass bei der Elektroporation zu viele oder auch alle Bakterien abgetötet wurden. Dies würde passieren, wenn sich in der Lösung noch Salze befinden und diese somit die Effizienz senken. Die Salze stören während der Elektroporation das angelegte elektrische Feld und können im Extremfall zu einer Kurzschlussreaktion im Gerät führen. Wie unter 3.3 gezeigt wurde, war die Ligation grundsätzlich erfolgreich, auch wenn man auf die Menge des korrekt ligierten Vektors nur schwer Rückschlüsse ziehen konnte. Daher kann als weiterer Grund angenommen werden, dass für diesen Bakterienstamm die Konzentration an ligiertem Vektor nicht ausreichend war. Ebenfalls kann es zu einem Coiling des ligierten Plasmids gekommen sein, sodass die Bakterien es nicht adäquat aufnehmen konnten.

Jedoch konnten auch mit den optimierten Bedingungen keine Klone kultiviert werden, sodass letztendlich der *Escherichia coli*-Stamm gewechselt wurde. Es wurde mit den *Escherichia coli* DH5 alpha-Zellen weitergearbeitet. Hierbei handelt es sich um *Escherichia coli*-Bakterien, die nach einer Hitzeschockbehandlung die DNA in die Zellen aufnehmen. Die kalziumreiche Umgebung führt zunächst dazu, dass die Abstoßungskräfte zwischen Plasmid-

DNA und der bakteriellen Zellmembran ausgeglichen werden. Durch den plötzlichen Temperaturanstieg werden Poren in der Zellmembran erzeugt, durch die dann die Plasmid-DNA in die Zellen gelangen. Normalerweise ist bei dieser Methode im Vergleich zur Elektroporation eine wesentlich geringere Anzahl an Klonen zu erwarten. Dennoch kam es hierbei zu einem ausreichenden Wachstum von Klonen, sodass mit diesen weitergearbeitet werden konnte. In der Plasmidisolierung erfolgte die Vervielfältigung des Plasmids. Die anschließende Transformation in die *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS*-Zellen mittels Elektroporation funktionierte wieder ohne Probleme. Bei der Elektroporation wird die Permeabilität der Plasmamembran durch ein extern angelegtes elektrisches Feld gesteigert. Einige Bakterien sterben hierbei allerdings ab, die restlichen Bakterien nehmen die DNA aus der Lösung auf und überleben. Hierbei ist in der Regel mit einer wesentlich höheren Ausbeute zu rechnen.

In Zusammenschau kann vermutet werden, dass eine Kombination aus Ligation und Bakterienstamm ursächlich für die fehlgeschlagene Transformation gewesen sein könnte, da mit dem alternativ verwendeten Bakterienstamm Klone erzeugt wurden und der Ligationsansatz derselbe war. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Tests bezüglich der fehlgeschlagenen Transformation konnte letztendlich keine Ursache gefunden werden.

Bei der Aufreinigung der entstandenen Fusionsproteine über die HPLC zeigten sich im Verlauf hohe Proteinverluste. Zunächst konnte über die C18-HPLC keine klare Trennung der Fusionsproteine von den noch vorhandenen bakteriellen Verunreinigungen aus der Expression erreicht werden (s. Abb. 3.7). Das Ersetzen der C18-Säule durch eine C4-Säule sowie die Änderung der Flussgeschwindigkeit führte dazu, dass eine Trennung erreicht werden und somit gezeigt werden konnte, dass das Fusionsprotein in den Fraktionen enthalten ist (s. Abb. 3.8).

In der Messung im Massenspektrometer (MS) im Anschluss an die Bromcyan-Spaltung konnte noch ein Anteil des ungespaltenen Fusionsproteins nachgewiesen werden. Auch nach Erhöhen von einem 50-fachen molaren Überschuss Bromcyan auf einen 500-fachen Überschuss im Anschluss, konnten nach wie vor beide Fusionsproteine im MS nachgewiesen werden. Die nicht vollständige Spaltung führte dementsprechend zu einer geringeren Ausbeute an Protein. Ein Grund hierfür kann zum Beispiel eine zu kurze Inkubationszeit sein, auch eine zu lange Inkubationszeit oder ein zu großer Überschuss kann zu Nebenreaktionen führen.

4.2 Antimikrobielle Aktivität von Profilaggrin

In dieser Arbeit wurden zwei weitere Fragmente des Profilaggrins, FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ untersucht, die sich in ihrer Länge lediglich um eine Aminosäure unterscheiden. Zur Herstellung dieser beiden Fragmente wurde ein verkürzter SUMO-Tag bestehend aus einem Hexahistidin-Tag und fünf weiteren Aminosäuren verwendet. Zwischen der kodierenden Sequenz des Tags und der FLG-Sequenz wurde im Vorfeld und wie bereits beschrieben, ein Methionin-Codon vor die kodierende Sequenz der zu generierenden Fragmente als Schnittstelle für die chemische Bromcyanspaltung hinzugefügt.

Im radialen Plattendiffusionstest wurden die beiden Proteine gegen ein repräsentatives Erregerspektrum getestet, die die verschiedenen Klassen der Erreger vertreten. Es wurde gegen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* und *Pseudomonas aeruginosa* getestet. In der Testung konnte weder für FLG₁₄₆₋₁₉₉ noch für FLG₁₄₆₋₂₀₀ antimikrobielle Wirksamkeit nachgewiesen werden. Das Ergebnis muss allerdings nicht bedeuten, dass diese Abschnitte des Filaggrins nicht antimikrobiell wirksam sind. Es ist möglich, dass sie aufgrund der Proteinverluste in der geringen Konzentration keine Wirkung zeigen und somit der radiale Plattendiffusionstest verfälscht wurde. Ebenso muss bedacht werden, dass sich *in vitro*-Bedingungen stark von den *in vivo*-Bedingungen unterscheiden. Trotz der Versuche, so nah wie möglich an die *in vivo*-Bedingungen heran zu kommen, kann es keine vollständige Garantie dafür geben. Das hier gewählte Verfahren ist ein einfacher Test, der bei gleichen Bedingungen gut reproduzierbar und kostengünstig ist.

Im Hinblick darauf, dass die meisten AMPs kationisch sind, wurden die pI-Werte (isoelektrischer Punkt) der beiden Proteine betrachtet (Hancock und Diamond, 2000). Anhand der Werte lassen sich Rückschlüsse auf die Kationizität ziehen. Dieser Wert beschreibt den pH-Wert, bei dem so viele positive wie negative Ladungen vorliegen, es liegt also keine Nettoladung vor. Der Ladungszustand sauren und basischen Gruppen der Aminosäuren ist abhängig vom pH-Wert. Ein niedriger pH-Wert drängt die Dissoziation der sauren Gruppen zurück, bei hohem pH-Wert sind die basischen Gruppen ungeladen.

FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ haben mit je 9,85 einen identischen Wert, der relativ hoch ist im Vergleich unter den bislang getesteten Filaggrin-Fragmenten und denen die antimikrobielle Aktivität aufweisen. Wenn man die pI-Werte der Filaggrin-Abschnitte betrachtet, für die in unserer Arbeitsgruppe eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden konnte, zeigt sich, dass diese stark kationischen pI-Werte mit 10,7 für PFLG₁₂₃₋₂₀₀ (Schulz, 2010) und 10,1 für PFLG₈₇₋₁₉₇ (Karsch, 2011) höher als zehn sind. Auch in der Dissertation von A. Schmidt ließ

sich bei FLG₇₆₄₋₉₀₃ mit einem pI-Wert von 11,44 antimikrobielle Aktivität nachweisen (Schmidt, 2012). Interessanterweise zeigte sich auch bei A. Schmidt bei FLG₂₈₄₉₋₂₉₀₀ mit einem pI-Wert von nur 7,21 ebenfalls Aktivität. Dieses Fragment liegt allerdings nicht wie die anderen in der B-Domäne oder C-terminal, sondern in der Repeat-Region des Profilaggrins. Bei allen weiteren getesteten Fragmenten, für die keine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden konnte, lag der pI-Wert unter zehn. In der Dissertation von K. Garske lagen die pI-Werte mit 9,31/ 9,63/ 9,99 sehr nahe an zehn. Jedoch zeigte sich auch hier bei keinem Fragment antimikrobielle Aktivität (Garske *et al.*, 2014). Allerdings zeigte PFLG₈₇₋₁₉₇ mit dem niedrigeren pI-Wert im Vergleich zu PFLG₁₂₃₋₂₀₀ gegen alle vier getesteten Keime (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* und *Pseudomonas aeruginosa*) Aktivität, während PFLG₁₂₃₋₂₀₀ keine Aktivität gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* aufwies. Interessant ist, dass FLG₁₂₃₋₂₀₀ antimikrobielle Aktivität zeigte. Das in dieser Arbeit getestete FLG₁₄₆₋₂₀₀ ist ein Teilstück von diesem und weist dennoch keine Aktivität auf. Ebenso zeigte FLG₁₆₂₋₁₈₄ (Garske, 2015) keine Aktivität auf, obwohl es vollständig in dem antimikrobiell aktiven FLG₁₂₃₋₂₀₀ (Schulz, 2010) enthalten ist. Tab. 4.1 zeigt einen Überblick über die bislang getesteten FLG-Fragmente und die entsprechenden pI-Werte.

Für die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin sowie für die neutralen Aminosäuren Glycin und Leucin ist beschrieben, dass sie einen hohen Anteil in den antimikrobiell aktiven Peptiden ausmachen (Lata, Sharma und Raghava, 2007). Für FLG₁₄₆₋₁₉₉ liegt der Anteil der vier Aminosäuren bei 40,7% von insgesamt 54 Aminosäuren. Bei FLG₁₄₆₋₂₀₀ ist der Anteil mit 41,8% von 55 Aminosäuren noch höher. Der Unterschied zum PFLG₁₂₃₋₂₀₀, das einen Anteil von 46,15% hat und antimikrobiell aktiv ist, ist nicht sehr groß. Einen geringen Anteil von 30,5% hat das PFLG₈₇₋₁₂₂, welches antimikrobiell nicht aktiv ist.

Ebenso beeinflusst ein saurer pH-Wert die antimikrobielle Aktivität von Histidin-reichen Peptiden (Kacprzyk *et al.*, 2007). Durch Ersetzen der Lysin- und Argininreste mit Histidinen konnte gezeigt werden, dass dadurch die antimikrobielle Fähigkeit der Histidin-reichen Peptide vollständig aufgehoben wurde. Histidine liegen unter physiologischen Bedingungen unprotoniert vor und werden durch einen sauren pH-Wert in der Umgebung protoniert und kationisch (Kacprzyk *et al.*, 2007). Dies zeigt, dass eine pH-Wert-Änderung einen sehr großen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität von Peptiden hat. Hauptangriffsort der meisten AMP ist die Zytoplasmamembran der Mikroorganismen. Zum Beispiel binden die positiv geladenen Defensine an die negativ geladene Plasmamembran der Bakterien und bilden dort Aggregate. Es kommt zu einer Porenbildung, über die ein Ladungsaustausch im Rahmen eines Ionentransports durch die Bakterienmembran stattfindet. Dies führt zur

Zerstörung der Mikroorganismen (Li *et al.*, 2012). Im radialen Plattendiffusionstest wurde nur mit einem System getestet, hier betrug der pH-Wert ungefähr 7,2. Es könnten weitere Testreihen angesetzt werden, die die antimikrobielle Aktivität in unterschiedlichen Milieus überprüft.

Der pH-Wert hat starken Einfluss auf das Wachstum von Mikroorganismen, jeder besitzt ein pH-Optimum, wo Wachstum möglich ist. Ebenso hat der pH-Wert Einfluss auf Proteine, eine Veränderung kann somit auch die Eigenschaften eines Proteins verändern und somit die antimikrobiellen Eigenschaften verändern.

Generell wird das Profilaggrin nicht zu den antimikrobiellen Peptiden gezählt. Es ist keiner der Untergruppen zugeordnet und auch wesentlich größer als die meisten bisher bekannten AMPs. Mehrere Funktionen des Profilaggrins sind bekannt. Unter anderem ist es an der Ausbildung des *Stratum corneums* während der Keratinozyten-Differenzierung beteiligt, in dem es Zytokeratinfilamente aggregiert und an der Ausbildung des „Cornified Cell Envelope“ beteiligt ist. Daher ist es denkbar, dass Profilaggrin auch an der antimikrobiellen Hautabwehr beteiligt ist. Hierzu sind allerdings noch weitere Studien nötig, um eine klare Zuordnung treffen zu können.

4.3 Spontane Alpha-N-6-Phosphogluconoylation

Bei der Auswertung der massenspektrometrischen Daten fielen bereits in den ersten Messungen der Fusionsproteine weitere Peaks neben den erwarteten Peaks auf. Die Massen der überprüften Fusionsproteine und später auch der Filaggrin-Fragmente stimmten mit den jeweils theoretisch ermittelten Werten überein.

Auffällig war, dass sich beim Fusionsprotein FLG₁₄₆₋₁₉₉ zwei weitere Massen ermitteln ließen, die auch in der chromatographischen Aufreinigung nicht von diesem getrennt werden konnten. Zum einen hatte es die Massendifferenz +178 Da, zum anderen +258 Da. Nach der Bromcyan-Spaltung war nur noch das Molekül mit der Massendifferenz von +178 Da im MS nachweisbar. Beim FLG₁₄₆₋₂₀₀ waren beim Fusionsprotein beide Differenzen vorhanden (+178 Da und +258 Da). In den massenspektrometrischen Messungen beider Filaggrin-Fragmente nach Bromcyan-Spaltung wurden Moleküle mit diesen Massendifferenzen nicht mehr detektiert. Das Auftreten dieser Massendifferenzen beschrieb bereits 1998 K. Geoghegan, der bei seiner Arbeit die Fraktionen genauer untersuchte (Geoghegan *u. a.*, 1999). Er wies nach, dass Proteine, die N-terminal die Aminosäuresequenz mit Histidin-Tag

Gly-Ser-Ser-(His)₆ enthalten und in *Escherichia coli* exprimiert werden, häufig neben der erwarteten Masse im MS noch mit einer Massendifferenz von +178 Da sowie seltener mit einer Massendifferenz von +258 Da vorkommen. Dabei handelt es sich um eine spontane alpha-N-6-Phosphogluconoylation des His-Tags in den *Escherichia coli*-Bakterien. Es findet eine Acylierung mit 6-Phosphoglucono-1,5-Lacton statt, welches bei der Synthese von Nukleinsäuren aus Glucose-6-Phosphat durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase entsteht. Durch eine nicht-enzymatische Reaktion von diesem mit einem Peptid entsteht ein Molekül mit der Massendifferenz von +258 Da. Dabei handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation, da die größte Menge im MS immer noch das zu erwartende Fusionsprotein war und nur geringe Mengen der Modifikation nachweisbar waren. Im Anschluss an die nicht-enzymatische Reaktion findet eine Dephosphorylierung durch eine Phosphatase statt, bei der aus dem +258 Da-Protein das +178 Da-Protein gebildet wird (Geoghegan *et al.*, 1999). Es wurde ebenfalls beschrieben, dass Peptide, in denen ein Serin in kurzer Distanz zum Histidin liegt, besser acyliert werden als andere Peptide (Ser-Xaa-His oder His-Xaa-Ser). Die Modifikationsrate sinkt sogar auf 4%, wenn der N-Terminus auf Ser-(His)₆ mit nur einem Serin in der Kette verändert wurde. Bei fehlendem Serin fand keine Modifikation statt. Dies lässt vermuten, dass die Acylierung vermutlich am Serin stattfindet. Dieses Phänomen wurde bislang nur mit N-terminalen Sequenzen getestet (Geoghegan *et al.*, 1999). Dabei scheint dies keinen Einfluss auf die Lage des Serins zu haben, solange die räumliche Nähe zum Histidin gegeben ist. Die Modifikation wurde sowohl für Ser-Haa-His, als auch für His-Xaa-Ser gezeigt. Der Histidin-Tag der von mir untersuchten Fusionsproteine enthält zwei Positionen neben den sechs Histidinen C-terminal die Aminosäure Serin (Gly-(His)₆-Gly-Ser-Leu-Gln-Glu-Met).

Diese spontane alpha-N-6-Phosphogluconoylation der beiden Fusionsproteine könnte zum Materialverlust der Proteine nach der Expression beigetragen haben. Es kann vermutet werden, dass die am His-Tag acylierten Fusionsproteine durch eine geänderte äußere Struktur nicht oder nur in einer geringen Menge an der Säule der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie gebunden haben. Dementsprechend begann bereits hier der Hauptteil des Materialverlusts. Es konnten trotzdem in der Fraktion aus der IMAC geringe Mengen der Modifikation mit aufgefangen werden, da sie ja im MS messbar waren. In der HPLC erfolgt die Trennung der Fraktionen anhand der Retentionszeiten der verschiedenen Komponenten.

Bei beiden massenspektrometrischen Messungen, also vor und nach Bromcyanspaltung, war die Modifikation jeweils nur in den Fraktionen mit dem Fusionsprotein bzw Fusionstag

enthalten und zeigte sich nicht in den Fraktionen der abgespaltenen Filaggrin-Proteine. Folglich findet hier eine Modifikation der Tag-Sequenz statt. Nach Spaltung zeigte sich im Massenspektrometer noch anteilig ungespaltenes Fusionsprotein mit den erwähnten Massendifferenzen. Es kann angenommen werden, dass bei den modifizierten Fusionsproteinen keine Abspaltung des Fusionstags durch Bromcyan stattgefunden hat. Dies würde ebenfalls den Proteinverlust bei der Bromcyanspaltung erklären. Nicht auszuschließen ist auch, dass doch ein kleiner Anteil von modifiziertem Fusionsprotein gespalten wurde, da die Modifikation am His-Tag erfolgt und dieser abgespalten wurde. Es kann am Zielprotein also nicht beurteilt werden, ob das Fusionsprotein diese Modifikation hatte oder nicht. Der His-Tag wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Dennoch muss die Modifikation aufgrund der Proteinverluste, die sich auf die Menge ausgewirkt haben, eine Rolle gespielt haben.

4.4 Antimikrobielle Peptide in Atopischer Dermatitis und Ichthyosis Vulgaris

Antimikrobielle Peptide (AMPs) spielen in verschiedenen Hauterkrankungen eine entscheidende Rolle. Es konnten sowohl bei einigen Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD) als auch Ichthyosis Vulgaris (IV) Mutationen im Filaggrin-Gen nachgewiesen werden (Akiyama, 2010; Cabanillas und Novak, 2016).

Die AD betrifft ca 20 % aller Kinder und stellt die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter dar. Das Erscheinungsbild ist geprägt von schubartigen Hautekzemen mit trockener und stark juckender Haut. Eine Filaggrin-Mutation konnte in 15-20 % bei allen europäischen Patienten mit AD nachgewiesen werden und stellt den größten genetischen Risikofaktor für die Entwicklung einer AD dar (Thomsen, 2014; Thyssen und Kezic, 2014). Es gibt zwei Hypothesen, mit denen versucht wird, die inflammatorischen Läsionen zu erklären. Man nimmt einerseits an, dass eine AD aus einem Ungleichgewicht von T-Helfer-Zellen entsteht (Leung, Jain und Leo, 2003). Es dominiert die T_{H2} -Differenzierung von nativen $CD4^{+}$ -Zellen, was die Produktion von Interleukin-4 und somit die IgE-Synthese erhöht und als Folge die T_{H1} -Differenzierung hemmt. Zusätzlich führt eine Überexpression von T_{H2} -Zytokinen zu einer Herunterregulierung der FLG-Expression während der Differenzierung (Howell *et al.*, 2009). Andererseits gibt es die Annahme, dass eine AD aus einer defekten Hautbarriere entsteht. Dies kommt dadurch zustande, dass durch die FLG-Mutation weniger FLG produziert wird und somit der transepidermale Wasserverlust zunimmt und es zu einem Ekzem der Haut kommt. Darüber können Allergene eindringen und

eine Allergensensitivierung oder Asthma auslösen (Thomsen, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit AD und FLG-Mutation eine stärkere Ausprägung, ein früheres Auftreten der Erkrankung, sowie einen niedrigeren Level an „Natural Moisturizing“-Faktoren (NMF) besitzen, da diese Abbauprodukte von FLG sind (Armengot-Carbo, Hernández-Martín und Torrelo, 2014; Thyssen und Kezic, 2014). Bei über 90 % der Patienten mit AD ist die Haut übermäßig mit dem gram-positiven Keim *Staphylococcus aureus* besiedelt (Leung, Jain und Leo, 2003; Schröder, 2011). Außerdem konnte bei AD-Patienten mit FLG-Mutation eine schwerere Form, sowie ein früherer Beginn der Erkrankung im Vergleich zu AD-Patienten ohne FLG-Mutation gezeigt werden. Der Barrieredefekt geht auf einen reduzierten Lipidgehalt der Epidermis zurück, entstanden durch eine reduzierte Filaggrin-Synthese. Bei Patienten mit AD wurden, unabhängig vom FLG-Mutation-Status, Unregelmäßigkeiten in der Bildung von freien Fettsäuren und Ceramiden gefunden. Durch Sekretion von $\text{INF-}\gamma$ in Patienten mit chronischer AD wurden zwei Fettsäure-Elongasen herunterreguliert, sodass keine langkettigen Fettsäuren entstehen konnten. Durch den hohen Anteil der kurzkettigen Fettsäuren resultierte ein Ungleichgewicht mit einer Barrierefunktionsstörung der Haut (Thyssen und Kezic, 2014). Ein reduzierter Fettgehalt sowie eine verminderte FLG-Synthese könnte eine Erklärung dafür sein, warum es zu einer pathologischen Bakterienkolonisation mit hauptsächlich *Staphylococcus aureus* der Haut kommt (Milani, 2013).

NMFs repräsentieren eine Gruppe von Substanzen an der Epidermis-Oberfläche, die in der Lage sind, Wasser zu binden und die in der Haut vorkommende Feuchtigkeit zu speichern. Sie verhindern das Austrocknen der Haut und werden ständig nachgebildet im Rahmen der Differenzierung.

Unter anderem durch Filaggrin und seine Abbauprodukte werden die Hydratation sowie der transepidermale Wasserverlust reguliert. Durch niedrige FLG-Level steigt der transepidermale Wasserverlust, auch der pH-Wert im *Stratum corneum* verändert sich. Durch geringere Level an NMF steigt der normal im sauren Bereich liegende pH im Stratum corneum an. In homozygoten FLG-Mutationen ist im Vergleich der pH-Level sogar am höchsten. Bei einigen FLG-Mutationsträgern kommt es zu einer kompensatorischen Hochregulierung von dem Natrium-Hydrogen-Antiporter, was einem pH-Anstieg entgegen wirkt und daher nicht bei allen Mutationsträgern ein weniger saurer pH-Wert im *Stratum corneum* gefunden wird. Der Natrium-Hydrogen-Antiporter ist ein Protein in der Zellmembran, welches H^+ -Ionen aus der Zelle und Na^+ -Ionen in die Zelle hinein transportiert. Die Hauptaufgabe des Antiporters liegt in der Regulation des intrazellulären pH-Wertes. Eine

Ansäuerung des Zellinneren führt demnach zu einer starken Aktivierung des Antiporters (Düsing und Roskopf, 1994). Ein saures Milieu in der Haut fördert die Ceramid-Synthese und verringert ebenfalls ein Wachstum von pathogenen Mikroorganismen (Thyssen und Kezic, 2014). Ein pH-Wert-Anstieg im *Stratum corneum* begünstigt somit zusätzlich die Bakterienkolonisation auf der Haut (Armengot-Carbo, Hernández-Martín und Torrelo, 2014). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sowohl hBD-2 als auch LL-37 in AD nicht hochreguliert und vermehrt exprimiert werden im Vergleich zu Patienten mit Psoriasis. hBD-2 ist in Anwesenheit von LL-37 in psoriatischen Läsionen gegen *Staphylococcus aureus* wirksam (Ong *et al.*, 2002). Zusätzlich sind beide auch gegen Viren und Pilze wirksam, allerdings nicht bei der AD. Es konnte gezeigt werden, dass die T_{H2}-Zellen über die Interleukin-Produktion die Expression von hBD-2 inhibieren und somit die Bildung von antimikrobiellen Peptiden verhindern (Ong *et al.*, 2002; Leung, Jain und Leo, 2003).

Die IV ist eine autosomal-dominante Störung der Keratinozyten, wobei es zu fehlenden oder reduzierten Keratohyalin granula aufgrund einer „loss of function“-Mutation im FLG-Gen kommt und somit die FLG-Expression im *Stratum granulosum* abnimmt (Sybert, Dale und Holbrook, 1985; Nirunsuksiri, 1994; Smith *et al.*, 2006). Das normalerweise in den Keratohyalin granula enthaltene Profilaggrin kann nicht mehr in seine Filaggrin-Untereinheiten gespalten werden (Thyssen, Godoy-Gijon und Elias, 2013). Klinische Symptome sind Xerosis, Keratosis pilaris und eine grobe Handfurchung. Bei dem autosomal dominantem Vererbungsmuster handelt es sich um „loss of function“-Mutationen, die mit 83-96 %-iger Penetranz vererbt werden (Irvine, 2011; Thyssen, Godoy-Gijon und Elias, 2013). Tatsächlich konnten die ersten nachgewiesenen FLG-Mutationen in Patienten mit IV identifiziert werden (R501X, 2282del4), mittlerweile sind über 47 Mutationen bekannt (Armengot-Carbo, Hernández-Martín und Torrelo, 2014). Im Verlauf entwickeln zwischen 35-70 % der IV-Patienten eine AD. Es konnte gezeigt werden, dass FLG-Mutationsträger ein vierfach erhöhtes Risiko im Vergleich zu Nicht-Mutationsträgern haben, eine AD zu entwickeln. Des Weiteren gibt es auch einen Zusammenhang zwischen niedrigeren Levels an NMF bei Mutationsträgern sowie erhöhte pH-Werte im *Stratum corneum* im Vergleich zu AD-Patienten ohne Mutation (Armengot-Carbo, Hernández-Martín und Torrelo, 2014).

4.5 Antimikrobielle Peptide als Therapeutika und Ausblick

Seit Jahren bereits existiert das Problem der multiresistenten Keime und die daraus resultierende fehlende Wirksamkeit von herkömmlichen Antibiotikaklassen.

Seitdem 1987 Zasloff die Magainine als antimikrobielle Peptide entdeckte, besteht das Interesse, aus den AMPs eine neue Klasse der Antibiotika zu entwickeln (Zasloff, 1987). Aufgrund der Tatsache, dass die AMPs insgesamt betrachtet gegen ein breites Spektrum antimikrobiell aktiv sind, stehen sie für einen potentiellen therapeutischen Nutzen im Fokus. Allerdings gestaltet sich das sehr problematisch, da die natürlich vorkommenden AMPs sehr labil gegenüber der Umwelt sind. Bereits in vivo sind die natürlichen AMPs stark abhängig von ihrem Umgebungsmilieu, sodass beispielsweise geringe Veränderungen des pH-Wertes oder Proteasen Auswirkungen auf ihre Produktion und Wirkung haben (Seo *et al.*, 2012). Aktuell auf dem Markt gibt es zwei alte, seit den 60er-Jahren bekannte, antimikrobielle Peptide als Antibiotika, die seit einiger Zeit aufgrund von hohen Nebenwirkungen nicht mehr eingesetzt werden. Durch das wachsende Resistenzproblem werden sie allerdings mittlerweile wieder als letzte Möglichkeit zur Behandlung schwerkranker Patienten eingesetzt. Hierbei handelt es sich um die Wirkstoffklasse der Polymyxine, von denen Polymyxin B und Polymyxin E (Colistin) in der Klinik Anwendung finden (Evans, Feola und Rapp, 1999; Loho und Dharmayanti, 2015). Beide werden bei Infektionen mit gram-negativen Bakterien, besonders *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* und *Acinetobacter baumannii* eingesetzt. Das dabei größte Problem ist die hohe Toxizität dieser Medikamente, die einen systemischen Gebrauch limitiert (Evans, Feola und Rapp, 1999; Falagas und Kasiakou, 2005). Der intravenöse Gebrauch ist nur bei ernsthaften Infektionen mit gram-negativen, gegen herkömmliche Antibiotika resistente, Bakterien indiziert. Polymyxin B kann im Gegensatz zu Colistin auch topisch bei Ohr- und Augeninfektionen angewandt werden (Falagas und Kasiakou, 2005). Die hohen Kosten in der Herstellung dafür sind ebenfalls noch ein Problem (Hancock, 1998, 2001; Marr, Gooderham und Hancock, 2006). In verschiedenen Studien wurde mit Modifikationen an Seitenketten versucht, die Toxizität abzuschwächen und auch die Stabilität zu verbessern, um ihnen einen Schutz vor proteolytischem Abbau zu geben. Die Ergebnisse waren bislang nicht zufriedenstellend (Seo *et al.*, 2012).

Durch den zu hohen und oft zu schnellen Einsatz der Antibiotika in Europa entwickelten die Bakterien Enzyme die in der Lage sind, die Beta-Laktam-Antibiotika zu spalten und somit wirkungslos zu machen. Die sogenannten Carbapenemase-produzierenden *Enterobacteriaceae*, die Beta-Laktame spalten, werden auch in den Krankenhäusern in Deutschland zu einem immer größeren Problem. Manche Bakterien sind mittlerweile auch gegen die 'last line'-Therapie mit Colistin resistent. Obwohl Deutschland eine bislang moderate Inzidenz dieser Erreger hat, werden doch immer mehr Colistin-Resistenzen in Europa beschrieben. Diese liegt bei insgesamt bei 28% (Grundmann *et al.*, 2016). Das

bedeutet, dass fast ein Drittel der mit Colistin behandelten Erkrankungen nicht mehr auf die Therapie ansprechen und das Colistin somit nicht mehr wirksam ist.

Es bleibt abzuwarten, ob es in den nächsten Jahren einen zielbringenden Erfolg in der Behandlung der multiresistenten Erreger gibt.

Filaggrin gehört aktuell nicht zu der Gruppe der AMPs. Da Filaggrin aber an wichtigen Funktionen in der Hautabwehr beteiligt ist wird vermutet, dass es ebenfalls zur antimikrobiellen Abwehr beiträgt. Dafür sprechen auch die bisher antimikrobiell wirksamen Fragmente, die *in vitro* Erreger abtöten konnten. Dennoch gilt es weiterhin die Teilsequenzen des insgesamt großen, aus 4061 Aminosäuren bestehenden, Profilaggrin-Moleküls zu untersuchen, um die genaue Funktion besser zu verstehen. Es bleibt abzuwarten, ob in naher Zukunft AMPs als Therapeutikum mit geringen Nebenwirkungen eingesetzt werden können und ob der Schlüssel bezüglich der sich ausbreitenden Antibiotikaresistenzen in der körpereigenen Erregerabwehr liegt.

5 Zusammenfassung

Die Haut steht als äußere Begrenzung des Körpers in ständigem Kontakt zur Umwelt und ist somit einer Vielzahl von Bakterien, Viren und Pilzen ausgesetzt. Trotz der permanenten Keimbelastung kommt es beim gesunden Menschen nur selten zu einer Hautinfektion. Zu den Schutzmechanismen der Haut gehören neben dem erworbenen und angeborenen Immunsystem auch eine intakte physikalische Barriere, sowie der Säureschutzmantel mit einem pH-Wert von 4,5-5. Es sind bereits mehrere antimikrobielle Peptide bekannt, die einen Teil zur angeborenen Immunabwehr des Menschen beitragen und sich in verschiedene Gruppen einteilen lassen: Defensine, Ribonukleasen, Cathelicidine und S100-Proteine. Profilaggrin gehört aktuell nicht zu der Gruppe der antimikrobiellen Peptide, sondern wird den „S100 Fused Type“-Proteinen zugeordnet, die eher strukturelle Funktionen in der Haut besitzen. Dennoch ist Profilaggrin sowie nach Spaltung in dessen Filaggrin-Untereinheiten an vielen Funktionen in der Haut beteiligt. Es wird vermutet, dass Abschnitte des Moleküls bei der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt sind.

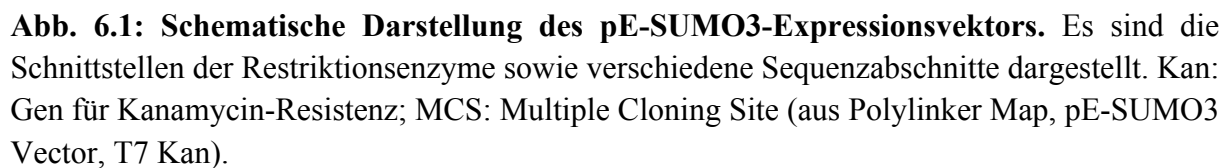
In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits mehrere Teilabschnitte des Profilaggrins hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität untersucht. Es konnten für mehrere Teilabschnitte antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen werden. Dabei waren unter anderem zwei N-terminal gelegene Abschnitte gegen das gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus*, das gram-negative Bakterium *Escherichia coli*, die Hefe *Candida albicans* sowie eins davon auch gegen das gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* antimikrobiell aktiv.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei weitere N-terminale Fragmente des Profilaggrins, FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀, daraufhin untersucht, ob sie zur antimikrobiellen Abwehr der Haut beitragen. Dafür wurden zunächst die Fragmente mittels PCR generiert, in den Klonierungsvektor pJet1.2/blunt ligiert und in die *Escherichia coli* XL1 blue-Zellen transformiert. Zur rekombinanten Expression wurden sie anschließend in den pE-SUMO3-Vektor ligiert und in die *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS-Zellen transformiert. Das zunächst als Fusionsprotein rekombinant exprimierte Protein wurde vom Fusionstag durch Bromcyan-Spaltung getrennt. Es erfolgte die chromatographische Aufreinigung und die Testung hinsichtlich der antimikrobiellen Aktivität. Für die getesteten Fragmente konnte jedoch keine antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* nachgewiesen werden.

Auch wenn bislang noch kein endgültiger Erfolg hinsichtlich des Einsatzes der AMPs als Therapeutika gegen die wachsende Anzahl multiresistenter Keime gelungen ist, bleibt es

dennoch in Zukunft spannend, ob neben den wenigen topisch anzuwendenden Medikamenten auch systemisch wirksame Antibiotika entwickelt werden können.

6.1.1 pE-SUMO3-Vektor



pJET1.2/blunt
2974 bp

bla (Amp^r)
2782

P_{T7}
16

NotI
328

BglII
422

KpnI
753

PspXI
1922

Eco88I
1762

XhoI
1148

P_{lacUV5}
1148

rep (pMB1)
1148

PCR product
blunt-end

pJET1.2 forward sequencing primer, 23-mer
T7 promoter
T7 transcription start
328
NotI
BglII
KpnI
5' GGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GCC GCC AGA TCT TCC GGA TG
3' CCG CAT TAT GCT GAG TGA TAT CCC TCT CGC CGG CGG TCT AGA AGG CCT AC
Ala Tyr Tyr Ser Glu Ser Tyr Pro Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ser Pro

pJET1.2 reverse sequencing primer, 24-mer
Eco88I
XhoI
371
372
XhoI
BglII
PspXI
BglI
Eco130I
Bsu15I
422
5' TAC AAT ATT CTC AGC TGC CAT GGA AAA TCG ATG TTC TTC T 3'
3' ATG TTA TAA GAG TCG ACG GTA CCT TTT AGC TAC AAG AAG A 5'
Val Ile Asn Glu Ala Ala Met Ser Phe His Glu Glu

Abb. 6.2: Schematische Darstellung des pJet1.2-Klonierungsvektors. Es sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sowie verschiedene Sequenzabschnitte dargestellt (aus Map und Features, CloneJET PCR Cloning Kit).

6.2 Filaggrin-Fragmente

6.2.1 FLG₁₄₆₋₁₉₉

Fusionsprotein:

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Molekulargewicht (Da): | 7907,5 |
| Theoretischer pI-Wert: | 9,70 |
| Extinktionskoeffizient (l/mol x cm): | 2980 |

Aminosäuresequenz:

(M)GHHHHHHGSLQEMETGGKRHESSEKKERKGYSPTTHREEEYGKNHHNSSKKEK
NKTENTRLGDNRKR

Protein:

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Molekulargewicht (Da): | 6381,8 |
| Theoretischer pI-Wert: | 9,85 |
| Extinktionskoeffizient (l/mol x cm): | 2980 |

Aminosäuresequenz (Aminosäuren 146-199):

ETGGKRHESSEKKERKGYSPTTHREEEYGKNHHNSSKKEKNKTENTRLGDNRKR

Nukleotidsequenz (bp 436-597):

gaaacaggggggaaaaggcatgaatctagtctgaaaaaaagaaaaggaatattcacctactcatagagaagaagaatatgga
aaaaaccatcataactcaagtaaaaaagagaaaaacaagactgaaaatactagattaggagacaataggaagagg

6.2.2 FLG₁₄₆₋₂₀₀

Fusionsprotein:

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Molekulargewicht (Da): | 8020,6 |
| Theoretischer pI-Wert: | 9,70 |
| Extinktionskoeffizient (l/mol x cm) | 2980 |

Aminosäuresequenz:

(M)GHHHHHHGSLQEMETGGKRHESSEKKERKGYSPTTHREEEYGKNHHNSSKKEK
NKTENTRLGDNRKRL

Protein:

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Molekulargewicht (Da) | 6495,0 |
| Theoretischer pI-Wert | 9,85 |
| Extinktionskoeffizient (l/mol x cm) | 2980 |

Aminosäuresequenz (Aminosäuren 146-200):

ETGGKRHESSEKKERKGYSPTTHREEEYGKNHHNSSKKEKNKTENTRLGDNRKRL

Nukleotidsequenz (bp 436-600):

gaaacaggggggaaaaggcatgaatctagttctgaaaaaaagaaagaaaaggatattcacctactcatagagaagaagaatatgga
aaaaaccatcataactcaagtaaaaaagagaaaaacaagactgaaaatactagattaggagacaataggaaggaggcta

6.3 Buchstabencodes der Aminosäuren

| | | |
|------------------------|-------------------|--------------------|
| A (Ala) Alanin | I (Ile) Isoleucin | R (Arg) Arginin |
| C (Cys) Cystein | K(Lys) Lysin | S (Ser) Serin |
| D (Asp) Asparaginsäure | L (Leu) Leucin | T (Thr) Threonin |
| E (Glu) Glutaminsäure | M (Met) Methionin | V (Val) Valin |
| F (Phe) Phenylalanin | N (Asn) Asparagin | W (Trp) Tryptophan |
| G (Gly) Glycin | P (Pro) Prolin | Y (Tyr) Tyrosin |
| H (His) Histidin | Q (Gln) Glutamin | |

6.4 Buchstabencodes der Basen

A Adenin
C Cytosin
G Guanin
T Thymin

7 Literaturverzeichnis

- Akiyama, M. (2010) „FLG mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema: spectrum of mutations and population genetics.“, *The British journal of dermatology*, 162(3), S. 472–7.
- Albiger, B., Dahlberg, S., Henriques-Normark, B. und Normark, S. (2007) „Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors.“, *Journal of internal medicine*, 261(6), S. 511–28.
- Alonso, L. und Fuchs, E. (2003) „Stem cells of the skin epithelium.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl, S. 11830–5.
- Andreev, Y. A., Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A. und Grishin, E. V. (2010) „Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions“, *Analytical Biochemistry*. Elsevier Inc., 407(1), S. 144–146.
- Armengot-Carbo, M., Hernández-Martín, A. und Torrelo, A. (2014) „The Role of Filaggrin in the Skin Barrier and Disease Development.“, *Actas dermo-sifiliograficas*, 106(2), S. 86–95.
- Babian, S. (2010). "Untersuchungen zur Rolle des Profilaggrin-Proteins FLG₃₆₀₅₋₃₈₇₉ in der antimikrobiellen Hautabwehr." Dissertation. Kiel: Christian-Albrechts-Universität.
- Bensch, K. W., Raida, M., Mägert, H.-J., Schulz-Knappe, P. und Forssmann, W.-G. (1995) „hBD-1: a novel β -defensin from human plasma“, *FEBS Letters*, 368, S. 331–335.
- Boguniewicz, M. und Leung, D. Y. M. (2010) „Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications.“, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(1), S. 4-13–5.
- Braff, M. H., Bardan, A. A., Nizet, V. und R. L. G. (2005) „Cutaneous Defense Mechanisms by Antimicrobial Peptides“.
- Brogden, K. A. (2005) „Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?“, *Nature reviews. Microbiology*, 3(3), S. 238–50.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. und Mattern, M. R. (2005) „SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins“, *Protein Expression and Purification*, 43(1), S. 1–9.
- Cabanillas, B. und Novak, N. (2016) „Atopic dermatitis and filaggrin“, *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd, 42(Figure 1), S. 1–8.
- Candi, E., Schmidt, R. und Melino, G. (2005) „The cornified envelope: a model of cell death in the skin.“, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(4), S. 328–40.

- Düsing, R. und Rosskopf, D. (1994) „Der Na⁺/H⁺-Antiport“, 2036(32).
- Elias, P. M. (2005) „Stratum Corneum Defensive Functions : An Integrated View“.
- Elias, P. M. (2007) „The skin barrier as an innate immune element“, *Seminars in Immunopathology*, 29(1), S. 3–14.
- Evans, M. E., Feola, D. J. und Rapp, R. P. (1999) „Polymyxin B sulfate and colistin: Old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria“, *Annals of Pharmacotherapy*, 33(9), S. 960–967.
- Falagas, M. E. und Kasiakou, S. K. (2005) „Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections“, *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), S. 1333–1341.
- Fleming, A. (1929) „ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM , WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B . INFLUENZAE .“, (1923).
- Freedberg, I. M., Eisen, A. Z., Wolff, K., Austen, K. F., Goldsmith, L. A. und Katz, S. I. (2003) „Fitzpatrick ’ s Dermatology In General Medicine“, *General Medicine*, S. 2900.
- Gan, S., McBride, W. und Idler, W. W. (1990) „Organization, Structure, and Polymorphisms of the Human Profilaggrin Gene“, (1987), S. 9432–9440.
- Garske, K. (2015). "Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG₁₇₆₋₂₀₇, FLG₁₆₂₋₁₈₄ und FLG₁₆₂₋₂₀₇ in der kutanen Abwehr". Dissertation. Kiel: Christian-Albrechts-Universität.
- Garske, K., Laudenbach, B., Hansmann, B., Bartels, J. und Schröder, J. M. (2014) „N-terminal profilaggrin peptide fragments as contributors to the antimicrobial barrier of the skin“. Abstract. 41th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Cologne. P046.
- Geoghegan, K. F., Dixon, H. B., Rosner, P. J., Hoth, L. R., Lanzetti, a J., Borzilleri, K. a, Marr, E. S., Pezzullo, L. H., Martin, L. B., LeMotte, P. K., McColl, a S., Kamath, a V und Stroh, J. G. (1999) „Spontaneous alpha-N-6-phosphogluconoylation of a ‚His tag‘ in Escherichia coli: the cause of extra mass of 258 or 178 Da in fusion proteins.“, *Analytical biochemistry*, 267(1), S. 169–84.
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E. und Schröder, J.-M. (2005) „Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection.“, *Nature immunology*, 6(1), S. 57–64.

- Grundmann, H., Glasner, C., Albiger, B., Aanensen, D. M., Tomlinson, C. T., Andrasević, A. T., Cantón, R., Carmeli, Y., Friedrich, A. W., Giske, C. G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D. M., Nordmann, P., Poirel, L., Rossolini, G. M., Seifert, H., Vatopoulos, A., Walsh, T., Woodford, N. und Monnet, D. L. (2016) „Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study“, *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(16), S. 1–11.
- Hale, J. D. F. und Hancock, R. E. W. (2007) „Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria.“, *Expert review of anti-infective therapy*, 5(6), S. 951–9.
- Hancock, R. (2001) „Review Cationic peptides : effectors in innate immunity and novel antimicrobials“, 1(October).
- Hancock, R. E. . und Diamond, G. (2000) „The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences“, *Trends in Microbiology*, 8(9), S. 402–410.
- Hancock, R. E. W. (1998) „The therapeutic potential of cationic peptides“, *Expert opinion on investigational drugs*, 7(2), S. 167–174.
- Hansmann, B., Schröder, J. M. und Gerstel, U. (2015) „Skin-Derived C-Terminal Filaggrin-2 Fragments Are *Pseudomonas aeruginosa*-Directed Antimicrobials Targeting Bacterial Replication“, *PLoS Pathogens*, 11(9), S. 1–21.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. und Schröder, J.-M. (1997) „A peptide antibiotic from human skin“, 236(1996), S. 1997.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. und Schröder, J. M. (2001) „Isolation and Characterization of Human β -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic“, *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), S. 5707–5713.
- Harder, J., Gläser, R. und Schröder, J.-M. (2007a) „Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity.“, *Journal of endotoxin research*, 13, S. 317–338.
- Harder, J., Gläser, R. und Schröder, J.-M. (2007b) „Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity.“, *Journal of endotoxin research*, 13(6), S. 317–38.
- Harder, J. und Schröder, J. (2005) „Antimicrobial Peptides in Human Skin“, 86, S. 22–41.
- Harder, J. und Schröder, J. M. (2002) „RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin“, *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), S. 46779–46784.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B. und Lotfipour, F. (2012) „Natural antimicrobial

peptides from bacteria : characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance“, S. 723–736.

Henseler, T. und Christophers, E. (1995) „Disease concomitance in psoriasis“, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 32(6), S. 982–986.

Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1988) „Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit I . Staining of sodium dodecyl sulfate gels“, S. 28–32.

Hoffjan, S. und Stemmler, S. (2007) „On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis.“, *The British journal of dermatology*, 157(3), S. 441–9.

Howell, M. D., Kim, B. E., Gao, P., Audrey, V., Boguniewicz, M., Debenedetto, A., Schneider, L., Beck, L. A., Barnes, K. C. und Leung, D. Y. M. (2009) „Cytokine Modulation of AD Filaggrin Skin Expression“, 120(1), S. 150–155.

Irvine, A. (2011) „Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases“, *New England Journal of Medicine*, S. 1315–1327.

Izadpanah, A. und Gallo, R. L. (2005) „Antimicrobial peptides.“, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52, S. 381-390-392.

Jackson, B., Tilli, C. M. L. J., Hardman, M. J., Avilion, A. a, MacLeod, M. C., Ashcroft, G. S. und Byrne, C. (2005) „Late cornified envelope family in differentiating epithelia--response to calcium and ultraviolet irradiation.“, *The Journal of investigative dermatology*, 124(5), S. 1062–70.

Kacprzyk, L., Rydengård, V., Mörgelin, M., Davoudi, M., Pasupuleti, M., Malmsten, M. und Schmidtchen, A. (2007) „Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions“, 1768, S. 2667–2680.

Karsch, D. (2011). "Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG₉₁₋₁₂₂ und FLG₈₇₋₁₉₇ in der kutanen Abwehr". Dissertation. Kiel: Christian-Albrechts-Universität.

Lata, S., Sharma, B. und Raghava, G. (2007) „Analysis and prediction of antibacterial peptides“, *BMC Bioinformatics*, 8(1), S. 263.

Leung, D. Y. M., Jain, N. und Leo, H. L. (2003) „New concepts in the pathogenesis of atopic dermatitis“, *Current Opinion in Immunology*, 15(6), S. 634–638.

Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y. und Su, Z. (2012) „Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application“, *Peptides*.

Elsevier Inc., 37(2), S. 207–215.

Loho, T. und Dharmayanti, A. (2015) „Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections.“, *Acta medica Indonesiana*, 47(2), S. 157–168.

Lüllmann-Rauch, R. 2009. "Taschenlehrbuch Histologie". 3. Auflage. Thieme-Verlag.

Makino, T., Mizawa, M., Yamakoshi, T., Takaishi, M. und Shimizu, T. (2014) „Expression of filaggrin-2 protein in the epidermis of human skin diseases: a comparative analysis with filaggrin.“, *Biochemical and biophysical research communications*. Elsevier Inc., 449(1), S. 100–6.

Markova, N. G., Marekov, L. N., Chipev, C. C., Gan, S. Q., Idler, W. W. und Steinert, P. M. (1993) „Profilaggrin Is Major Epidermal Calcium-Binding Protein“, 13(1).

Marr, A. K., Gooderham, W. J. und Hancock, R. E. (2006) „Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook“, *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), S. 468–472.

McKinley-Grant, L. J., Idler, W. W., Bernstein, I. a, Parry, D. a, Cannizzaro, L., Croce, C. M., Huebner, K., Lessin, S. R. und Steinert, P. M. (1989) „Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(July), S. 4848–4852.

Milani, M. (2013) „The epidermal barrier function and antimicrobial peptides in atopic dermatitis: The role of topical modulation“, *OA Dermatology*, 1(1), S. 1–4.

Mischke, D., Korge, B., Marenholz, I., Volz, A., Ziegler, A. (1996) „Genes Encoding Structural Proteins of Epidermal Cornification and S100 Calcium-Binding Proteins Form a Gene Complex (,Epidermal Differentiation Complex‘) on Human Chromosome 1q21“.

Moll, I. (2010) "Duale Reihe Dermatologie", 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986) „Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction“, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, S. 263–273.

Nemes, Z. und Steinert, P. M. (1999) „Bricks and mortar of the epidermal barrier“, 31(1), S. 5–19.

Nirunsuksiri, W. (1994) „Decreased Profilaggrin Expression in Ichthyosis Vulgaris is a Result of Selectively Impaired Posttranscriptional Control“.

- Ong, P. Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R. L. und Leung, D. Y. M. (2002) „Endogenous Antimicrobial Peptides and Skin Infections in Atopic Dermatitis“, *New England Journal of Medicine*, 347(15), S. 1151–1160.
- Pearson, D. J., Dale, B. A. und Presland, R. B. (2002) „Functional Analysis of the Profilaggrin N-Terminal Peptide: Identification of Domains that Regulate Nuclear and Cytoplasmic Distribution“, S. 661–669.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G. und Götz, F. (1999) „Inactivation of the dlt operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides“, *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), S. 8405–8410.
- Presland, R. B., Haydock, V., Fleckmanl, P., Nirunsuksiriii, W. und Dale, B. A. (1992) „Characterization of the Human Epidermal Profilaggrin Gene“, S. 23772–23781.
- Sambrook, J., Fritsch, E. und Maniatis, T. (1982) „Molecular Cloning“, S. 545.
- Sandilands, A., Smith, F. J. D., Irvine, A. D. und McLean, W. H. I. (2007) „Filaggrin’s fuller figure: a glimpse into the genetic architecture of atopic dermatitis.“, *The Journal of investigative dermatology*, 127(6), S. 1282–4.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A. D. und McLean, W. H. I. (2009) „Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease.“, *Journal of cell science*, 122(Pt 9), S. 1285–94.
- Schauber, J. und Gallo, R. L. (2007) „Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes.“, *The Journal of investigative dermatology*, 127, S. 510–512.
- Schmidt, A., Hansmann, B., Bartels, J., Schröder, J. (2012). "Profilaggrin peptide fragments as contributors to the antimicrobial barrier of the skin". Abstract. 39th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Marburg. P023.
- Schröder, BO., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marcinowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E.F., Wehkamp, J. (2011) "Reduction of disulphide bonds unmasks potent antinicrobial activity of human β -defensin 1" *Nature*, 469 (7330), S. 419-423.
- Schröder, J.-M. (2011) „Antimicrobial peptides in healthy skin and atopic dermatitis.“, *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 60(1), S. 17–24.
- Schröder, J. M. (1999) „Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response

- elements.“, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 56(1–2), S. 32–46.
- Schröder, J. M. (1999) „Epithelial peptide antibiotics“, *Biochemical Pharmacology*, 57(98), S. 121–134.
- Schröder, J. M. und Harder, J. (2006) „Antimicrobial skin peptides and proteins.“, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(4), S. 469–86.
- Schulz, C.F. (2010). "Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG₈₇₋₁₂₂ und FLG₁₂₃₋₂₀₀ in der kutanen Abwehr". Dissertation. Kiel: Christian-Albrechts-Universität.
- Seo, M.-D., Won, H.-S., Kim, J.-H., Mishig-Ochir, T. und Lee, B.-J. (2012) „Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review.“, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(10), S. 12276–86.
- Simanski, M., Köten, B., Schröder, J.-M., Gläser, R. und Harder, J. (2012) „Antimicrobial RNases in cutaneous defense.“, *Journal of innate immunity*, 4(3), S. 241–7.
- Smith, F. J. D., Irvine, A. D., Terron-kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A. T., Goudie, D. R., Lewis-jones, S., Arseculeratne, G., Regan, O., Bale, S. J., Compton, J. G., Digiovanna, J. J., Munro, C. S., Sergeant, A., Fleckman, P. und Mclean, W. H. I. (2006) „Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris“, 38(3), S. 337–342.
- Steinberg, D. a und Lehrer, R. I. (1997) „Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the ‚one-size-fits-all‘ theory.“, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 78, S. 169–186.
- Sybert, V. P., Dale, B. A. und Holbrook, K. A. (1985) „Ichthyosis vulgaris: identification of a defect in synthesis of filaggrin correlated with an absence of keratohyaline granules.“, *The Journal of investigative dermatology*. Elsevier Masson SAS, 84(3), S. 191–4.
- Thomsen, S. F. (2014) „Atopic Dermatitis: Natural History, Diagnosis, and Treatment“, *ISRN Allergy*. Hindawi Publishing Corporation, 2014, S. 1–7.
- Thyssen, J. P., Godoy-Gijon, E. und Elias, P. M. (2013) „Ichthyosis vulgaris: The filaggrin mutation disease.“, *British Journal of Dermatology*, 168, S. 1155–1166.
- Thyssen, J. P. und Kezic, S. (2014) „Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis“, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Ltd, 134(4), S. 792–799.
- Valore, E. V und Ganz, T. (1997) „Laboratory production of antimicrobial peptides in native

conformation“, 78(1).

Wu, Z., Latendorf, T., Meyer-Hoffert, U. und Schröder, J.-M. (2011) „Identification of trichohyalin-like 1, an s100 fused-type protein selectively expressed in hair follicles.“, *The Journal of investigative dermatology*, 131(8), S. 1761–3.

Wu, Z., Meyer-Hoffert, U., Reithmayer, K., Paus, R., Hansmann, B., He, Y., Bartels, J., Gläser, R., Harder, J. und Schröder, J.-M. (2009) „Highly complex peptide aggregates of the S100 fused-type protein hornerin are present in human skin.“, *The Journal of investigative dermatology*, 129(6), S. 1446–58.

Yang, D., Chertov, O. und Oppenheim, J. J. (2001) „Cellular and Molecular Life Sciences The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity“, 58, S. 978–989.

Yeaman, M. R. und Yount, N. Y. (2003) „Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.“, *Pharmacological reviews*, 55(1), S. 27–55.

Zasloff, M. (1987) „Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(August), S. 5449–5453.

Zasloff, M. (2002) „Antimicrobial peptides of multicellular organisms“, 415(January), S. 389–395.

Zasloff, M. (2009) „Antimicrobial peptides and suppression of apoptosis in human skin.“, *The Journal of investigative dermatology*, 129(4), S. 824–6.

8 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder, für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und für die hervorragende Betreuung bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Britta Hansmann und Dr. Ties Latendorf, die mich während der gesamten Zeit tatkräftig unterstützt haben. Eure ermutigenden Worte, die wertvollen Ratschläge und der Satz „Tja, so ist halt die Wissenschaft!“ ermunterten mich zur Fortführung der Arbeit.

Für die große Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeiten möchte ich mich bei dem gesamten Team im Labor der Hautklinik bedanken. Vielen Dank an Anke, Britta, Claudia, Felix, Jan, Joachim, Jutta, Ties und Uli. Der Dank geht auch an Silvia im mikrobiologischen Institut für die Unterstützung bei der Durchführung der antimikrobiellen Tests.

Bei Jutta, Claudia und Anke, sowie Britta und Ties möchte ich mich ganz herzlich bedanken, die mich bei der Durchführung der HPLC-Läufe unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester sowie Maria für die Durchsicht dieser Arbeit! Ohne euch wäre das Studium und die Promotion nicht möglich gewesen!

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie hat weder ganz noch zum Teil an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Kiel, den 05.11.2018

Bettina J. Laudenbach

Teilpublikation:

Garske, K., Laudenbach, B., Hansmann, B., Bartels, J. und Schröder, J. M. (2014) „N-terminal profilaggrin peptide fragments as contributors to the antimicrobial barrier of the skin“. Abstract. 41th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Cologne. P046.